

Die Funktionen von Profilin und Ena/VASP-Proteinen in der intrazellulären Motilität von *Listeria monocytogenes*

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Marcus Geese

aus Gifhorn

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 30. Juli 2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 22. November 2001

2001

(Druckjahr)

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit Prof. Dr. Jürgen Wehland, im folgendenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Geese M, Schlüter K, Rothkegel M, Jockusch BM, Wehland J, Sechi AS:
Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci.* 2000, **113**: 1415-26.

Tagungsbeiträge

Geese M, Loureiro JJ, Gertler FB, Wehland W, Sechi AS: **Analysis of the role of Ena/VASP protein domains in the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*.**
(Poster) ISOPOL XIV (International Symposium On Problems Of Listeriosis),
Mannheim 2001

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------|
| Vorveröffentlichungen der Dissertation..... | I |
| Inhaltsverzeichnis..... | II |
| Abbildungsverzeichnis..... | VI |
| Tabellenverzeichnis..... | VII |
| Abkürzungen und englische Fachbegriffe | VIII |

1 EINLEITUNG 1

| | |
|--|----|
| 1.1 Das Zytoskelett eukaryonter Zellen | 1 |
| 1.2 Mikrofilamentstrukturen und -dynamik | 1 |
| 1.3 Komponenten des Mikrofilamentsystems | 3 |
| 1.3.1 Aktin | 3 |
| 1.3.2 Arp2/3-Komplex | 4 |
| 1.3.3 Thymosin- β 4..... | 5 |
| 1.3.4 “capping“-Proteine | 5 |
| 1.3.5 Cofilin..... | 5 |
| 1.3.6 Profilin..... | 5 |
| 1.3.7 Ena/VASP-Proteine | 8 |
| 1.4 Listerienmotilität als Modellsystem der Mikrofilamentdynamik | 11 |
| 1.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> | 12 |
| 1.4.2 Der Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i> | 12 |
| 1.4.3 Aktin-vermittelte Listerienmotilität | 14 |
| 1.4.4 ActA..... | 15 |
| 1.5 Listerienmotilität und zelluläre Mikrofilamentdynamik | 16 |
| 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit..... | 20 |

2 MATERIAL UND METHODEN..... 22

| | |
|--|----|
| 2.1 Materialien..... | 22 |
| 2.2 Bakterienkultur | 22 |
| 2.2.1 <i>Escherichia coli</i> | 23 |
| 2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> | 23 |
| 2.3 Molekulare Gentechnik | 24 |
| 2.3.1 Plasmide..... | 24 |
| 2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 24 |
| 2.3.3 Mutagenese der Enden von Genen..... | 25 |
| 2.3.4 Gerichtete Deletionsmutagenese | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.3.5 | Gerichtete Punktmutagenese..... | 26 |
| 2.3.6 | cDNA-Klonierung | 27 |
| 2.3.7 | TOPO-TA-Cloning..... | 28 |
| 2.3.8 | DNA-Agarosegelelektrophorese | 28 |
| 2.3.9 | DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen..... | 29 |
| 2.3.10 | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | 29 |
| 2.3.11 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten..... | 30 |
| 2.3.12 | Ligation..... | 30 |
| 2.3.13 | Transformation in <i>E. coli</i> | 30 |
| 2.3.14 | Plasmid-DNA Präparation | 31 |
| 2.3.15 | DNA-Sequenzierung | 32 |
| 2.4 | Proteinbiochemie..... | 33 |
| 2.4.1 | Proteinextrakte..... | 33 |
| 2.4.2 | Bradford Proteinbestimmung..... | 33 |
| 2.4.3 | SDS-PAGE | 34 |
| 2.4.4 | Western-Blot..... | 35 |
| 2.4.5 | Immunodetektion und Chemoluminiszenz..... | 36 |
| 2.4.6 | Immunfluoreszenzmikroskopie..... | 37 |
| 2.5 | Gewebekultur | 38 |
| 2.5.1 | Medien und Zusätze..... | 38 |
| 2.5.2 | Kulturmateriail..... | 39 |
| 2.5.3 | Zellen und Kulturbedingungen | 40 |
| 2.5.4 | Trypsinisieren und Passage..... | 41 |
| 2.5.5 | Lagerung in Stickstoff..... | 42 |
| 2.6 | Gentransfer in Eukaryontenzellen..... | 42 |
| 2.6.1 | Transfektion mit FuGENE 6 | 42 |
| 2.6.2 | Retroviraler Gentransfer | 42 |
| 2.7 | Durchflußzytometrie..... | 44 |
| 2.8 | Infektion eukaryonter Zellen mit <i>Listeria monocytogenes</i> | 45 |
| 2.9 | Mikroskopie..... | 46 |
| 2.10 | Videomikroskopieanalyse und Statistische Methoden..... | 47 |
| 2.10.1 | Vergleich der Profilin II-GFP Fluoreszenzintensität mit der listeriellen Geschwindigkeit..... | 47 |
| 2.10.2 | Analyse der Listeriengeschwindigkeit in MV ^{D7} Zellen..... | 48 |
| 3 | ERGEBNISSE | 50 |
| 3.1 | Klonierung von GFP-markierten Profilin I und Profilin II | 50 |
| 3.2 | Profilin II-GFP lokalisiert spezifisch an Listerien | 51 |
| 3.3 | Die GFP-Markierung verändert nicht die Ligandenbindung des Profilin II-GFP..... | 52 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.4 | Profilin II-GFP lokalisiert in “focal adhesions”, Lamellipodien und Filopodien | 55 |
| 3.5 | Nur motile Listerien rekrutieren Profilin II-GFP | 57 |
| 3.6 | Die Profilin-Rekrutierung korreliert mit der Listeriengeschwindigkeit | 59 |
| 3.7 | VASP und Profilin kolokalisieren nur an motilen Listerien | 61 |
| 3.8 | Profilin wird durch Ena/VASP-Proteine zu motilen Listerien rekrutiert | 63 |
| 3.9 | In Ena/VASP-freien Zellen ist die Listerienmotilität stark eingeschränkt | 64 |
| 3.10 | Die Listerienmotilität wird durch Mena und VASP gleichermaßen gefördert | 66 |
| 3.11 | Die exprimierte Ena/VASP-Menge bedingt die Geschwindigkeit der Listerien | 68 |
| 3.12 | Ena/VASP-Mutanten | 70 |
| 3.13 | Klonierung der VASP-Mutanten und Rekonstitution der MV ^{D7} Zellen..... | 74 |
| 3.14 | Lokalisation der Mena und VASP Konstrukte in MV ^{D7} Zellen | 78 |
| 3.15 | Die Prolin-reichen Regionen der Ena/VASP-Proteine sind essentiell für die effiziente Listerienmotilität..... | 80 |
| 3.16 | Die Listerienmotilität wird durch die Deletion der potentiellen G-Aktin-Bindungsdomäne von Mena reduziert | 84 |
| 3.17 | Der Verlust der F-Aktinbindungsdomäne der Ena/VASP-Proteine steigert die Listerienmotilität..... | 85 |
| 3.18 | Die Multimerisierungs-Domäne der Ena/VASP-Proteine ist für die Listerienmotilität nicht essentiell | 87 |
| 3.19 | Die Phosphorylierung der Ena/VASP-Proteine erhöht die Listerienmotilität | 88 |
| 3.20 | Zusammenfassung der Motilitätsexperimente in Ena/VASP-rekonstituierten MV ^{D7} Zellen | 89 |
| 4 | DISKUSSION | 92 |
| 4.1 | Profilin-GFP funktioniert als fluoreszierender Marker..... | 92 |
| 4.2 | Profilin interagiert mit Ena/VASP-Proteinen während der Listerienmotilität | 93 |
| 4.3 | Die Profilin-Ena/VASP-Interaktion könnte reguliert sein | 94 |
| 4.4 | Ena/VASP-freie Zellen ermöglichen die <i>in vivo</i> -Analyse der Ena/VASP-Proteine..... | 95 |
| 4.5 | Ena/VASP-Proteine fördern <i>in vivo</i> die Aktinpolymerisation durch Profilin Rekrutierung | 97 |
| 4.6 | F-Aktinbindung und Multimerisierung der Ena/VASP-Proteine behindern die Listerienmotilität..... | 99 |
| 4.7 | Die Ena/VASP-Phosphorylierung fördert die Aktinpolymerisation | 101 |
| 4.8 | Aktin-vermittelte Listerienmotilität und zelluläre Mikrofilamentdynamik | 102 |
| 4.9 | Ausblick..... | 105 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 107 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 108 |

| | | |
|----------|------------------------|------------|
| 7 | DANKSAGUNG..... | 123 |
|----------|------------------------|------------|

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1: Die Ena/VASP-Protein Familie | 9 |
| Abbildung 2: Der Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i> | 14 |
| Abbildung 3: ActA | 16 |
| Abbildung 4: Modell der intrazellulären Listerienmotilität | 18 |
| Abbildung 5: Vergleich der intrazellulären Motilität von Listerien, Shigellen und Vaccinien..... | 19 |
| Abbildung 6: Vergleich der Mikro-filamentorganisation in Lamellipodien und Listerienschweifen.... | 20 |
| Abbildung 7: “overlap-extension“-PCR | 26 |
| Abbildung 8: Retroviraler Gentransfer | 43 |
| Abbildung 9: Lokalisation von Profilin II-GFP in Listerien infizierten PtK2 Zellen | 52 |
| Abbildung 10: Die Ligandenbindungseigenschaften des Profilin II-GFP unterscheiden sich nicht vom unmarkierten Profilin | 54 |
| Abbildung 11: Lokalisation von Profilin II-GFP in “focal adhesions” | 55 |
| Abbildung 12: Profilindynamik in Lamellipodien | 56 |
| Abbildung 13: Profilin wird nur von motilen Listerien rekrutiert..... | 58 |
| Abbildung 14: Die Profilinrekrutierung verhält sich dynamisch | 59 |
| Abbildung 15: Korrelation der Listeriengeschwindigkeit und Profilinrekrutierung | 60 |
| Abbildung 16: Profilin kolokalisiert mit VASP nur an motilen Listerien..... | 62 |
| Abbildung 17: Ena/VASP-Proteine vermitteln die Rekrutierung von Profilin zu <i>Listeria monocytogenes</i> | 63 |
| Abbildung 18: Vergleich von <i>Listeria monocytogenes</i> EGD wt mit <i>Listeria monocytogenes</i> Δ ActA5 in MV ^{D7} und PtK2 Zellen | 65 |
| Abbildung 19: Die Listerienmotilität wird durch Mena und VASP gleichermaßen gefördert..... | 67 |
| Abbildung 20: Die Listerienmotilität korreliert mit der Ena/VASP-Menge | 69 |
| Abbildung 21: “alignment“ der Ena/VASP-Proteine..... | 70 |
| Abbildung 22: VASP und Mena Mutanten..... | 72 |
| Abbildung 23: Durchflußzytometrie in der Herstellung äquivalent exprimierender Zellpopulationen. | 77 |
| Abbildung 24: Lokalisation von GFP-VASP und GFP-VASP Δ Coco in MV ^{D7} Zellen..... | 80 |
| Abbildung 25: Die Prolin-reichen Regionen der Ena/VASP-Proteine sind essentiell für die effiziente Listerienmotilität..... | 82 |
| Abbildung 26: Die Deletion der potenziellen G-Aktinbindungsdomäne von Mena reduziert die Listerienmotilität..... | 85 |
| Abbildung 27: Die Deletion der F-Aktinbindungsdomäne steigert die Listerienmotilität | 86 |
| Abbildung 28: Die Multimerisierungsdomäne ist für die Listerienmotilität nicht essentiell..... | 87 |
| Abbildung 29: Die Phosphorylierung der Ena/VASP-Proteine steigert die Listerienmotilität. | 89 |
| Abbildung 30: Modell der Ena/VASP-Funktionen in der Listerienmotilität | 104 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Plasmide | 24 |
| Tabelle 2: Antikörper in der Immunodetektion | 37 |
| Tabelle 3: Antikörper in der Immunfluoreszenz | 37 |
| Tabelle 4: Filterkombinationen für die Fluoreszenzmikroskopie | 47 |
| Tabelle 5: Oligonukleotide für die “reverse“-Transkriptase PCR von Profilin | 50 |
| Tabelle 6: Oligonukleotide für die Klonierung von Profilin-GFP bzw. GFP-Profilin | 51 |
| Tabelle 7: Linker zwischen Profilin und EGFP | 51 |
| Tabelle 8: Oligonukleotide für die Klonierung von Profilin II in pGEX-2T | 52 |
| Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung von pMSCV+EGFP-VASP | 66 |
| Tabelle 10: Mena Konstrukte | 73 |
| Tabelle 11: VASP Konstrukte | 73 |
| Tabelle 12: Oligonukleotide für die VASP-Phospho- und Dephosphomutanten | 74 |
| Tabelle 13: Oligonukleotide für die VASP Deletionsmutagenese | 75 |
| Tabelle 14: Lokalisation der GFP-VASP und GFP-Mena Konstrukte in MV ^{D7} Zellen | 79 |
| Tabelle 15: Oligonukleotide für die CFP und YFP Klonierung | 83 |
| Tabelle 16: Zusammenfassung der Motilitätsexperimente in Ena/VASP-rekonstituierten MV ^{D7} Zellen | 91 |

ABKÜRZUNGEN UND ENGLISCHE FACHBEGRIFFE

| | |
|------------------|---|
| A | Ampere |
| ActA | Aktin Nukleationsfaktor |
| ADF | Aktinfilament depolymerisierender Faktor ("actin-depolymerizing-factor") |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Arp | Aktin verwandtes Protein ("actin-related-protein") |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| "barbed end" | Plus-Ende der Aktinfilamente |
| bp | Basenpaare |
| °C | Grad Celsius |
| cAMP | cyklisches Adenosinmonophosphat ("cyclic AMP") |
| CFP | Cyan fluoreszierendes Protein |
| cGMP | cyklisches Guanosinmonophosphat ("cyclic GMP") |
| Coco | Multimerisierungs-Domäne ("coiled coil") |
| Δ | Deletion |
| Da | Dalton |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ECFP | Optimiertes cyan fluoreszierendes Protein ("enhanced cyan fluorescent protein") |
| EGFP | Optimiertes grün fluoreszierendes Protein ("enhanced green fluorescent protein") |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| Ena | <i>Drosophila</i> Ena/VASP- Familienmitglied <i>enabled</i> |
| EVH | konservierte Ena/VASP-Domäne ("Ena/VASP-homology") |
| Evl | Ena/VASP-Familienmitglied ("Ena/VASP-like-protein") |
| EYFP | Optimiertes gelb fluoreszierendes Protein ("enhanced yellow fluorescent protein") |
| FAB | F-Aktin Bindung |
| FCS | fötales Kälberserum |
| "focal adhesion" | Zell-Matrix Verbindung |
| g | Gramm |
| GAB | G-Aktin Bindung |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| h | Stunde |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl-β-D-galactopyranosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| "knockout" | funktionsunfähiges Gen |
| l | Liter |
| M | Molar |
| MEM | "minimal essential medium" |

| | |
|------------------|--|
| Mena | Ena/VASP-Familienmitglied (“mammalian-enabled”) |
| min | Minute |
| mRNA | Boten RNA (“messenger RNA“) |
| MW | Molekulargewicht |
| “nested“-Primer | Oligonukleotid-Primer, der innerhalb eines linearen DNA-Fragments bindet |
| N-WASP | WASP/Scar-Familienmitglied (“neural-WASP“) |
| OD | optische Dichte |
| ORF | freies Leseraster in der DNA-Transkription (“open reading frame“) |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung (“phosphate buffered saline“) |
| PCR | DNA-Polymerasekettenreaktion (“polymerase chain reaction“) |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| “pointed end” | Minus-Ende der Aktinfilamente |
| PRR | Prolin-reiche Region |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| “ruffles“ | hochdynamische, saumartige Zellmembranauswüchse |
| Scar | WASP/Scar-Familienmitglied (“suppressor of cAMP-receptor”) |
| SDS | sodium-dodecyl-sulfate |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| sek | Sekunde |
| SH3 | Proteinbindungsdomäne (“Src-homology type 3“) |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBS-T | Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (“Tris-buffered saline“) |
| TEMED | N,N,N,N-tetramethyl-ethylen-diamin |
| “template“ | Matrize für die DNA-Polymerase |
| U | Einheit (“unit“) |
| ü.N. | über Nacht |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| VASP | Vasodilatator-stimuliertes-Phosphoprotein |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| WASP | WASP/Scar-Familienmitglied (“Wiscott-Aldrich syndrome protein“) |
| w/v | Masse pro Volumen |
| WW | Proteinbindungsdomäne |
| YFP | Gelb fluoreszierendes Protein (“yellow fluorescent protein“) |

1 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der Funktion zweier Komponenten des Mikrofilamentsystems, Profilin und Ena/VASP-Proteinen, in der Aktinpolymerisation an motilen Listerien. Die Einleitung beschreibt deshalb die Rolle des dynamischen Mikrofilamentsystems in eukaryonten Zellen und der daran beteiligten Aktin-bindenden Proteine. Auf Profilin und Ena/VASP-Proteine wird dabei detailliert eingegangen. Die Bedeutung der intrazellulären Listerienmotilität als dereguliertes Modellsystem zellulärer Mikrofilamentdynamik wird erläutert.

1.1 Das Zytoskelett eukaryonter Zellen

Das Zytoskelett bestimmt die Form, organisiert das Zytoplasma, ermöglicht intrazelluläre Transportvorgänge sowie die Zellteilung und erzeugt die Motilität der eukaryonten Zellen. Es werden drei Teilsysteme unterschieden: das Mikrofilamentsystem, das Mikrotubulisystem und das Intermediärfilamentsystem. Alle basieren auf Polymeren, die filamentöse Komponenten bilden, und auf Faktoren, die den Auf- und Abbau und die Vernetzung dieser Polymere mit anderen Zellkomponenten ermöglichen.

Das Mikrofilamentsystem oder Aktinfilamentsystem erlaubt die Zytokinese, bestimmt und verändert die Form tierischer Zellen, vermittelt der Zelle Kontakte zu ihrer Umgebung und ermöglicht die Zellmotilität. Es wird aus Aktin und Aktin-assoziierten Proteinen aufgebaut und durchspannt Zellen unter Ausbildung vielfältiger Strukturen. Aktinmonomere und die daraus aufgebauten Aktinfilamente bilden den Hauptbestandteil des Mikrofilamentsystems, die durch die Aktin-assoziierten Proteine reguliert werden (Alberts *et al.*, 1995). Das Mikrofilamentsystem wird im folgenden näher beschrieben.

1.2 Mikrofilamentstrukturen und -dynamik

Verschiedene Organisationsformen von Mikrofilamenten spiegeln deren unterschiedliche Funktionen wieder. Bündel aus parallel angeordneten Aktinfilamenten bilden zylindrige Oberflächenaustülpungen, die sog. Mikrovilli

(DeRosier, 2000). Antiparallel angeordnete Aktinfilamente bilden Bündel, die sich vermittelt durch Myosin kontrahieren können. Diese Strukturen finden sich in Muskelzellen, im kontraktilen Ring und in sog. Stressfasern in kultivierten Zellen. Die Stressfasern beginnen in den sog. “focal adhesions”, den Kontakt- und Verankerungspunkten von Zelle und extrazellulärer Matrix (Heath and Holifield, 1993, Jockusch *et al.*, 1995). Im submembranösen Kortex vieler Nicht-Muskelzellen kommen dreidimensionale Netzwerke aus langen Aktinfilamenten vor. Sie vermitteln der Zelle Stabilität und sind die Basis von Lamellipodien und “ruffles“. Lamellipodien sind flache Membranausläufer, die durch polymerisierende Aktinfilamente ausgebildet werden. Polarisierte Zellen bilden breite Lamellipodien an ihrer Front aus, die durch “focal adhesions” an der extrazellulären Matrix fixiert werden können. Nicht fixierte Lamellipodien bilden sich zurück, indem sie als Membranwelle, den “ruffles“, über die Zelloberfläche zurücklaufen. In Lamellipodien kommen verdichtete Filamentbündel vor, die sog. “mikrospikes“ oder Filopodien, die sich parallel zur Lamellipodienfront bewegen und auch über die Front hinausragen können. (Small *et al.*, 1996, Welch *et al.*, 1997 a).

Viele der beschriebenen Mikrofilamentstrukturen sind an Prozessen der Zellmotilität beteiligt. Während der Embryogenese bewegen sich Zellen durch den sich entwickelnden Organismus und erreichen so die Orte, an denen sie zu verschiedenen Geweben ausdifferenzieren. Die Axone der Nervenzellen entstehen durch eine Wanderung ihres Wachstumskegels. Eine Infektion mobilisiert Zellen des Immunsystems, so dass Entzündungsreaktionen ausgelöst werden. Bei der Wundheilung regeneriert das verletzte Gewebe. Krebszellen können motil werden und dadurch Metastasen bilden. Derartige zelluläre Vorgänge kommen durch eine koordinierte Aktinpolymerisation zustande, die durch Signaltransduktionswege reguliert wird (Kaibuchi *et al.*, 1999, Hall and Nobes, 2000). Dadurch beginnt eine polarisierte Lamellipodienbildung, die Fixierung dieser Zellausläufer am Substrat durch “focal adhesions”, das Auflösen alter Substratverbindungen und schließlich die aktive Retraktion des Zellkörpers in Richtung des neu etablierten Lamellipodiums. Das Wachstum der Aktinfilamente beginnt dabei in einer Polymerisationszone an der Lamellipodienfront. Es werden Filamente gebildet, die stationär im weiter wachsenden Lamellipodium zurückbleiben, bis sie wieder depolymerisieren. Die

regulierte Dynamik der Mikrofilamente ist somit die Basis für Aktin-vermittelte Motilität (Small *et al.*, 1978, 1995, 1996, Wang, 1985, Theriot and Mitchison, 1991, Pantaloni *et al.*, 2001).

1.3 Komponenten des Mikrofilamentsystems

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Komponenten des Mikrofilamentsystems beschrieben, die an den Vorgängen der Aktin-vermittelten Motilität beteiligt sind. Die Eigenschaften von Profilin und Ena/VASP-Proteinen werden detailliert erläutert, da sie das Thema dieser Arbeit bilden.

1.3.1 Aktin

Aktinmonomere oder G-Aktin (globuläres Aktin) bilden Polymere, die als Aktinfilamente oder F-Aktin (filamentöses Aktin) bezeichnet werden. *In vitro* beginnt nach dem Überschreiten einer kritischen Aktinkonzentration spontan der Polymerisationsprozess. Der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Nukleation, in der ein Aktintrimer gebildet wird. Dieses Trimer wird im zweiten Schritt, der Elongation, durch Polymerisation weiterer Monomere schnell verlängert. Schließlich entsteht ein Fließgleichgewicht, in dem sich Polymerisation und Depolymerisation die Waage halten. Dabei läuft die Polymerisation am Plus-Ende, und die Depolymerisation am Minus-Ende schneller ab, so dass die Untereinheiten des Filaments durch das gesamte Polymer wandern während die Länge konstant bleibt. Dieser Prozess wird als “treadmilling“ (Tretmühlenmechanismus) bezeichnet. Das Plus-Ende kann durch die Dekoration des Filaments mit Myosinfragmenten unter dem Elektronenmikroskop identifiziert werden. Es erscheint durch die Dekoration aufgefächert und wird deshalb als “barbed end“, das spitze Minus-Ende als “pointed end“ bezeichnet. Bei der Polymerisation findet ein Konformationswechsel der Aktinuntereinheiten statt, dem zeitverzögert die Hydrolyse des vor der Polymerisation gebundenen ATP zu ADP folgt. Das Plus-Ende besteht deshalb aus einer ATP-Aktin-Kappe, während der Rest der Untereinheiten ADP gebunden hat. Die ADP-Bindung destabilisiert das Filament, so dass die Depolymerisation am Minus-Ende bevorzugt stattfindet (Alberts *et al.*, 1995).

Diese Eigenschaften des Aktins werden in Zellen durch Aktin-assoziierte Proteine modifiziert und reguliert. Sie induzieren die Nukleation, beeinflussen die Polymerisation oder Depolymerisation an den Filamentenden, schneiden oder vernetzen Filamente, sequestrieren Aktinmonomere und katalysieren den Nukleotidaustausch (Sun *et al.*, 1995, Carlier, 1998).

1.3.2 Arp2/3-Komplex

Der Arp2/3-Komplex nukleiert Aktinfilamenten und organisiert sie in dendritisch verzweigte Netzwerke (Machesky and Gould, 1999, Welch, 1999).

Er besteht aus sieben Untereinheiten, die zuerst aus *Acanthamoeba* durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Profilin isoliert wurden (Machesky *et al.*, 1994). Arp2 und Arp3 ("actin-related-protein") zeigen eine hohe Homologie zu Aktin (Tanaka *et al.*, 1992, Michaille *et al.*, 1995, Frankel and Mooseker, 1996). *In vitro* wird der Arp2/3-Komplex durch die aminoterminal Domäne des ActA-Proteins aktiviert, und dadurch die Aktinnukleation auslöst (Welch *et al.*, 1998). ActA ist ein Virulenzfaktor des intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes*. Es rekrutiert zelluläre Komponenten des Mikrofilamentsystems und induziert dadurch die Aktin-vermittelte Listerienmotilität (s. 1.4). Die ActA-Analoge WASP ("Wiscott-Aldrich syndrome protein"), N-WASP ("neural-WASP"), Bee1p und Scar ("suppressor of cAMP receptor") haben eine vergleichbare aktivierende Wirkung auf den Arp2/3-Komplex und fördern ebenfalls die Aktinfilamentnukleation (Machesky und Insall, 1998, Machesky *et al.*, 1999, Rohatgi *et al.*, 1999, Winter *et al.*, 1999, Yazar *et al.*, 1999).

Der Arp2/3-Komplex nukleiert nicht nur Aktinfilamente, sondern bindet auch an die erzeugten "pointed ends" (Mullins *et al.*, 1997, 1998, Mullins and Pollard, 1999). In elektronenmikroskopischen Darstellungen bindet er außerdem seitlich an Aktinfilamente, so dass eine Quervernetzung und Bündelung von Aktinfilamenten zustande kommt. Dadurch können in Lamellipodien dendritisch verzweigte Aktinfilamentnetzwerke entstehen (Mullins *et al.*, 1997, Blanchoin *et al.*, 2000, Bailly *et al.*, 2001). Übereinstimmend mit diesen Funktionen lokalisiert der Arp2/3-Komplex in der aktinreichen Peripherie von Amöben (Machesky *et al.* 1994, Kelleher *et al.*, 1995), sowie in "actin patches" und "actin cables" von *Saccharomyces cerevisiae* und

Shizosaccharomyces pombe (McCollum *et al.* 1996, Moreau *et al.* 1996), an der Oberfläche motiler intrazellulärer Listerien und Shigellen und in deren Aktinschweif sowie in Lamellipodien (Machesky *et al.*, 1997, Welch *et al.*, 1997 b).

1.3.3 Thymosin- β 4

Thymosin- β 4 bindet ADP-G-Aktin und sequestriert dadurch den größten Teil der zellulären Aktinmonomere, so dass eine spontane Aktinpolymerisation verhindert wird (Nachmias, 1993, Carlier and Pantaloni, 1994). Die sequestrierten Aktinmonomere können an Profilin abgegeben und dadurch wieder Polymerisationsprozessen zugeführt werden (Pantaloni and Carlier, 1993).

1.3.4 “capping“-Proteine

Die “capping“-Proteine, u.a. Gelsolin, CapZ und das “capping-protein“, blockieren selektiv die “barbed ends” von Aktinfilamenten und regulieren dadurch die Aktinfilamentdynamik. Die Filamentelongation konzentriert sich dann ausschließlich auf die nicht abgeblockten “barbed ends”. Sie können teilweise Aktinfilamente durchtrennen, so dass viele kürzere Filamente erzeugt werden, die entweder verlängert oder beschleunigt abgebaut werden können (Carlier, 1998, Schafer *et al.*, 1998).

1.3.5 Cofilin

Cofilin (auch ADF (“actin-depolymerizing factor“) genannt) bindet bevorzugt das ADP-Aktin in Aktinfilamenten und steigert dadurch die Depolymerisationsrate an den “pointed ends”. Auch wurde eine Filament-schneidende Aktivität nachgewiesen, die den Umsatz der Aktinfilamente weiter steigern und so eine erhöhte und variable Mikrofilamentdynamik ermöglicht (Carlier *et al.*, 1997, Theriot, 1997, Bamburg *et al.*, 1999, Blanchoin and Pollard, 1999).

1.3.6 Profilin

Profilin ist ein 12 - 15 kDa kleines, ubiquitär vorkommendes Protein, das zuerst als G-Aktin sequestrierendes Protein beschrieben wurde (Carlsson *et al.*, 1977), und das den Nukleotidaustausch am G-Aktin katalysieren kann (Goldschmidt-Clermont *et al.*,

1992, Lu and Pollard, 2001). Außer mit Aktinmonomeren interagiert es mit bestimmten Prolin-reichen Motiven und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). (Pantaloni and Carlier, 1993, Reinhard *et al.*, 1995, Sohn *et al.*, 1995, Watanabe *et al.*, 1997, Suetsugu *et al.*, 1998, Ahern-Djamali *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1999).

Zu Beginn dieser Arbeit waren in Säugetieren die zwei Isoformen Profilin I und Profilin II bekannt. Profilin I wird ubiquitär exprimiert, während Profilin II vor allem in neuronalen Zellen vorkommt (Honore *et al.*, 1993, Lambrechts *et al.*, 1995, 1997, Witke *et al.*, 1998, Giesemann *et al.*, 1999). Im Herbst 2000 wurde festgestellt, dass Profilin II gewebespezifisch in zwei alternativen Splicevarianten, Profilin IIa und IIb, exprimiert wird (Di Nardo *et al.*, 2000, Lambrechts *et al.*, 2000 a). Profilin IIa wird vor allem in neuronalen Geweben und Profilin IIb in Niere, Haut und Leber exprimiert.

Profiline spielen in der Aktindynamik eine essentielle Rolle (Sohn *et al.*, 1994, Schlüter *et al.*, 1997). *Dictyostelium discoideum* Mutanten, die kein Profilin exprimieren, zeigen einen höheren Aktinfilamentanteil und Defekte der Motilität und Zytokinese (Haugwitz *et al.*, 1994). Profilin I “knockout“-Mäuse sterben in einem sehr frühen Stadium der Embryonalentwicklung (Witke *et al.*, 2001). *Drosophila* Mutanten des Profilin Homologen *chickadee* zeigen Defekte der Oozytenformation, der Mitose und der Zellwanderung (Cooley *et al.*, 1992, Verheyen and Cooley, 1994). Auch die Aktin-vermittelte Listerien- und Shigellenmotilität wird durch Profilin beeinflusst (Theriot *et al.*, 1994, Marchand *et al.*, 1995, Sanger *et al.*, 1995, Laurent *et al.*, 1999, Mimuro *et al.*, 2000).

Bei geschützten “barbed ends” agiert Profilin *in vitro* als G-Aktin sequestrierendes Protein. Zusammen mit Thymosin-β₄ kann Profilin jedoch die Aktinpolymerisation fördern, wenn die “barbed ends” nicht geschützt werden. Dabei mobilisiert Profilin Aktinmonomere aus dem Thymosin-β₄:Aktin-Pool, katalysiert den Nukleotidaustausch und überträgt sie auf die Aktinfilamente (Pantaloni and Carlier, 1993, Kang *et al.*, 1999).

Die Analyse der Ligandenbindungseigenschaften einer Vielzahl von Profilinmutanten (Björkegren *et al.*, 1993, 2000, Sohn *et al.*, 1995, Björkegren-Sjögren *et al.*, 1997, Haykova *et al.*, 1997, Korenbaum *et al.*, 1998, Schlüter *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2000)

in Kombination mit der Aufklärung der Tertiärstruktur (Archer *et al.*, 1993, Metzler *et al.*, 1993, Schutt *et al.*, 1993, Vinson *et al.*, 1993, Metzler *et al.*, 1994, 1995, Nodelmann *et al.*, 1999) erlaubte die Identifikation und Charakterisierung der Profilin-Bindungsdomänen. Profilin ist ein sehr kompakt gebautes Protein. Es besitzt eine Oberflächenregion mit einer hydrophoben Spalte, die mit Prolin-reichen Regionen mit einem XP₅-Konsensusmotiv (X = G, L, I, S oder A) interagieren. Dabei interkalieren aromatische Aminosäuren des Profilins in die Polyprolin-Typ-II-Helix des XP₅-Motivs. Dieses Motiv bindet spezifisch Profilin und unterscheidet sich von bekannten SH3- oder WW-Bindungsmotiven (Reinhard *et al.*, 1995, Kang *et al.*, 1997, Nodelmann *et al.*, 1999, Holt and Koffer, 2001). Prolin-reiche Interaktionspartner des Profilins mit diesem Motiv sind die Ena/VASP-Proteine (s. 1.3.7), WASP und N-WASP (Reinhard *et al.*, 1995, Gertler *et al.*, 1996, Watanabe *et al.*, 1997, Anton *et al.*, 1998, Suetsugu *et al.*, 1998, Ahern-Djamali *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1999). Diese Profilinliganden kolokalisieren in Bereichen aktiver Aktinpolymerisation wie z.B. Lamellipodien und an intrazellulären Listerien und rekrutieren Profilin:Aktin-Komplexe. Die herantransportierten Aktinmonomere können an die hier vorhandenen ungeschützten “barbed ends” polymerisieren und dadurch die Filamentelongation fördern (Buss *et al.*, 1992, Theriot *et al.*, 1994, Mayboroda *et al.*, 1997, Neely and Macaluso, 1997).

Die Profilin-Bindungsflächen für Aktinmonomere und PIP₂ überlappenden teilweise. Die PIP₂-Bindung an Profilin schließt deshalb eine gleichzeitige Bindung von Aktin aus (Lassing and Lindberg, 1985, 1988, Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990, 1991). Das PIP₂ Phospholipid wird als Resultat von äußeren Signalen an der Innenseite der Plasmamembran gebildet. Wahrscheinlich kann Profilin durch die PIP₂-Bindung zur Plasmamembran rekrutiert werden und dadurch nicht mehr auf das Mikrofilamentsystem einwirken. Dies würde eine direkte Einbindung von Profilin in Signaltransduktionsprozesse bedeuten (Lassing and Lindberg, 1985).

Vergleichende Analysen der Ligandenbindungseigenschaften von Profilin I und II lieferten teilweise widersprüchliche Ergebnisse bis erkannt wurde, dass unterschiedliche Profilin II-Isoformen verwendet wurden (Gieselmann *et al.*, 1995, Lambrechts *et al.*, 1995, 1997). Profilin IIa zeigt gegenüber Aktinmonomeren und Prolin-reichen Peptiden aus VASP, Evl und Mena *in vitro* eine höhere Affinität als die

beiden anderen Isoformen, hat aber eine geringere Affinität zu PIP₂ (Jonckheere *et al.*, 1999, Di Nardo *et al.*, 2000, Lambrechts *et al.*, 2000 a).

1.3.7 Ena/VASP-Proteine

Die Ena/VASP-Proteine bilden eine Proteinfamilie deren Mitglieder in vielen Geweben nachgewiesen wurden. In Säugerzellen werden VASP (Vasodilatator-stimuliertes-Phosphoprotein), Mena (“mammalian-enabled“) und Evl (“Ena/VASP-like protein“) exprimiert. Homologe wurden aus *Drosophila* (Ena), Mäusen, Huhn (Avena) und aus *Caenorhabditis* (Unc34) kloniert (Reinhard *et al.*, 2001).

Ena/VASP-Proteine beeinflussen Prozesse, die auf Aktin-vermittelter Motilität beruhen. VASP wurde als Substrat für cAMP- und cGMP-abhängige Kinasen in Thrombozyten identifiziert (Halbrügge *et al.*, 1990, Halbrügge and Walter, 1990, Haffner *et al.*, 1995) und die VASP Phosphorylierung korreliert mit einer Hemmung der Blutplättchenaggregation (Nolte *et al.*, 1991, Butt *et al.*, 1994, Aszodi *et al.*, 1999). VASP wurde auch in Verbindung mit Tumorentstehung gebracht (Liu *et al.*, 1999). Das *Drosophila* Ena wurde als Suppressor einer Abelson-Tyrosin-Kinase (Abl) Mutation identifiziert (Gertler *et al.*, 1990) und ist in die Wachstumsverzögerung von Axonen involviert (Bashaw *et al.*, 2000). Ena Mutationen führen zu einem rezessiv letalen Phänotyp aufgrund von Neurulationsdefekten (Wills *et al.*, 1999). Evl wurde wie Mena aufgrund von Sequenzhomologien zu Ena identifiziert (Gertler *et al.*, 1996). Mena beeinflusst Aktinpolymerisations- und Neurulationsprozesse von Mäusen (Gertler *et al.*, 1996, Lanier *et al.*, 1999, Bear *et al.*, 2000). Auch die Listerienmotilität wird durch Ena/VASP-Proteine gefördert (Chakraborty *et al.*, 1995).

Konsequenterweise lokalisieren diese Proteine in Strukturen mit exponierten Aktinfilament-”barbed ends“ wie der Lamellipodienfront und den Filopodienspitzen, Zellverbindungen, Stressfasern und intrazellulären Listerien (Reinhard *et al.*, 1992, 1995, Gertler *et al.*, 1996, Lanier *et al.*, 1999, Rottner *et al.*, 1999, Bear *et al.*, 2000, Lambrechts *et al.*, 2000 b, Vasioukhin *et al.*, 2000). An den Stressfasern kolokalisiert VASP punktiert mit α -Aktinin und Zyxin in den Bereichen, an denen die “barbed ends“ eingebunden sind.

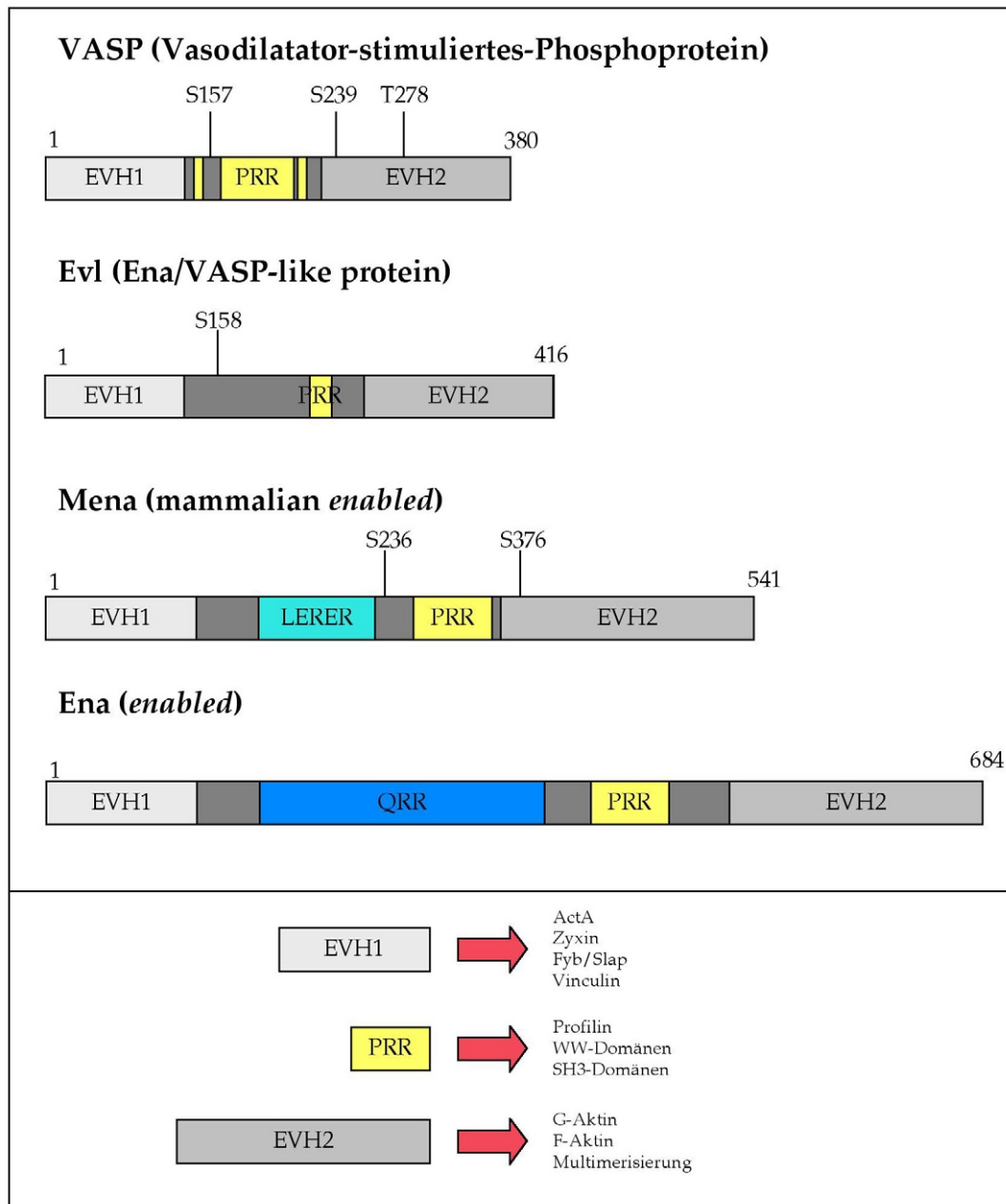


Abbildung 1: Die Ena/VASP-Protein Familie

Die Proteine VASP, Evl, Mena und Ena sind schematisch dargestellt und die homologen Domänen farblich hervorgehoben. Die möglichen Interaktionspartner der Domänen sind im unteren Teil dargestellt: Die EVH1-Domäne kann mit ActA, Zyxin, Fyb/SLAP und Vinculin interagieren, die Prolin-reichen Domänen (PRR) mit Profilin und Proteinen, die SH3 oder WW-Domänen enthalten, und die EVH2-Domäne kann möglicherweise mit Aktinmonomeren, Aktinfilamenten und anderen Ena/VASP-Proteinen interagieren. Die Phosphorylierungsstellen die durch cAMP- und cGMP-abhängigen-Kinasen phosphoryliert werden, sind oberhalb des Proteins hervorgehoben. Mena und Ena besitzen weitere Glutamin-reiche Domänen (QRR) und Regionen mit vielfacher Wiederholung des LERER Motivs.

Das Kriterium für die Ena/VASP-Proteinfamilie ist eine konservierte Domänenstruktur aus einer aminoterminalen EVH1-Domäne (“Ena/VASP homology“), zentralen Prolin-reichen Regionen und einer carboxyterminalen EVH2-

Domäne. Unterschiede zwischen ihnen finden sich vor allem im zentralen Bereich (Abbildung 1).

Die dreidimensionale Struktur der EVH1-Domäne ist als einziger Teil der Ena/VASP-Proteine aufgeklärt (Prehoda *et al.*, 1999, Federov *et al.*, 1999, Ball *et al.*, 2000, Barzik *et al.*, 2000). Sie bildet einen Bindungsspalt aus, dessen aromatische Aminosäuren spezifisch in die Prolin-Helix eines D/E FPPPPXD-Konsensusmotivs (FP₄-Motiv) interkalieren. Das Phenylalanin und die flankierenden sauren Aminosäuren dieses Motivs sind entscheidend für die Spezifität dieser Bindung (Carl *et al.*, 1999, Holt and Koffer, 2001). Dieses FP₄-Motiv kommt in Vinculin, Zyxin, Fyb/SLAP, dem listeriellen ActA, Robo (*roundabout*) und Semaphorin 6A-1 vor (Chakraborty *et al.*, 1995, Brindle *et al.*, 1996, Gertler *et al.*, 1996, Reinhard *et al.*, 1996, Niebuhr *et al.*, 1997, Bashhaw *et al.*, 2000, Drees *et al.* 2000, Klostermann *et al.*, 2000, Krause *et al.*, 2000). Die Deletion dieser Bindungsregion in ActA verhindert die Interaktion mit Ena/VASP-Proteinen und hemmt die Listerienmotilität (Smith *et al.*, 1996, Niebuhr *et al.*, 1997). Peptide mit dem FP₄-Motiv von ActA delokalisieren Ena/VASP-Proteine durch Konkurrenz mit ihren zellulären Liganden Vinculin, Zyxin und Fyb/SLAP und interferieren dadurch mit der Zellausbreitung (Southwick and Purich, 1994, Pistor *et al.*, 1995, Drees *et al.*, 2000, Krause *et al.*, 2000).

Die zentralen Prolin-reichen Regionen haben eine unterschiedliche Struktur und Größe. Die Proline bilden wahrscheinlich eine Poly-L-Prolin TypII-Helix aus, deren Spezifität für ihre Bindungspartner durch die flankierenden Aminosäuren definiert wird (s. auch 1.3.6) (Holt and Koffer, 2001). Sie können spezifisch entweder Profilin oder Proteine mit SH3- oder WW-Domänen rekrutieren (Reinhard *et al.*, 1995, Gertler *et al.*, 1996, Ermekova *et al.*, 1997, Reinhard *et al.*, 2001). Mena und Profilin interagieren in Mäusen gemeinsam in der Neurulation, da eine Kombination der entsprechenden “knockouts“ die leichten Neurulationseffekte eines Mena “knockouts“ potenziert (Lanier *et al.*, 1999). In Evl überlappen die Bindungsstellen für Profilin und SH3-Domänen, so dass Profilin mit den SH3-Liganden Abl, Lyn und n-Src kompetitiert (Lambrechts *et al.*, 2000 b). In einigen Ena/VASP-Proteinen finden sich im zentralen Bereich weitere glutaminreiche Motive (QRR) oder Bereiche mit Wiederholungen der Aminosäuren LERER, deren Funktion unbekannt ist.

Die EVH2-Domäne besteht aus mehreren konservierten Subdomänen (Bachmann *et al.*, 1999). Ein Motiv (259-276 in humanem VASP) interagiert *in vitro* mit Aktinfilamenten und ein potentiell sog. “coiled coil“-Motiv (343-380) vermittelt eine Ena/VASP-Multimerisierung. So bildet VASP *in vitro* bevorzugt Tetramere und durch synergistische Aktinfilamentbindung sowie Multimerisierung kann die EVH2-Domäne auch *in vitro* Aktinfilamente bündeln (Bachmann *et al.*, 1999, Hüttelmaier *et al.*, 1999, Laurent *et al.*, 1999, Harbeck *et al.*, 2000, Lambrechts *et al.*, 2000 b).

Ena/VASP-Proteine werden durch cAMP- und cGMP-abhängige Kinasen *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert. Das Serin 157 (humanes VASP) ist in Mena und Evl konserviert, das Serin 239 nur in Mena und das Threonin 278 ist nur in VASP eine Phosphorylierungsstelle. Die Dephosphorylierung erfolgt durch die Serin/Threonin-Dephosphatasen PP2A, PP2b und PP2C *in vitro* (Butt *et al.*, 1994, Haffner *et al.*, 1995). Die Phosphorylierung von VASP korreliert mit der Hemmung der Thrombozytenaggregation (Nolte *et al.*, 1991, Horstrup *et al.*, 1994, Aszodi *et al.*, 1999), mit der Ausbreitung von Neutrophilen (Lawrence *et al.*, 2001) und *in vitro* Experimente zeigen, dass die VASP-Phosphorylierung die Aktin-Interaktion beeinflusst (Laurent *et al.*, 1999, Harbeck *et al.*, 2000). Die *in vitro* Phosphorylierung von Evl interferiert mit der Aktinnukleation und Aktinpolymerisation sowie mit der SH3-Domäne-Bindung (Lambrechts *et al.*, 2000 b).

Insgesamt zeigen diese Studien, dass Ena/VASP-Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation der Mikrofilamentdynamik spielen. Die Interaktionsebenen mit dem Mikrofilamentsystem sind offensichtlich sehr vielfältig und werden zudem durch den Phosphorylierungsgrad beeinflusst. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente erschienen deshalb teilweise verwirrend und widersprüchlich (Machesky, 2000, Reinhard *et al.*, 2001).

1.4 Listerienmotilität als Modellsystem der Mikrofilamentdynamik

Die Vielfalt der beteiligten Faktoren (s.o.) und die vielfältigen regulativen Einflüsse z.B. durch GTP-asen der Rho-Familie (Schmitz *et al.*, 2000) erschweren die Untersuchung des Mikrofilamentsystems in lebenden Zellen. Die Analyse der

intrazellulären Listerienmotilität als dereguliertes Modellsystem der Mikrofilamentdynamik kann helfen, diese Schwierigkeiten zu umgehen. Die Listerienmotilität wird im Gegensatz zu Prozessen zellulärer Aktin-vermittelter Motilität von nur einem listeriellen Virulenzfaktor, dem ActA, induziert und wird nicht durch Signaltransduktionswege beeinflusst (s. u.). Die Aktinfilamentdynamik kann so zuerst isoliert von der zellulären Regulation untersucht werden und beschränkt sich auf die Aktin-assoziierten Proteine. Die gewonnenen Erkenntnisse können dann in die Analyse des zellulären Mikrofilamentsystems integriert werden, da in der Listerienmotilität dieselben bzw. analogen Faktoren verwendet werden (s. u.).

1.4.1 *Listeria monocytogenes*

Das human- und tierpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* ist Gram-positiv, motil, stäbchenförmig, fakultativ anaerob und kann aus Gewässern, Boden und Vegetation isoliert werden. Es gelangt durch kontaminierte Lebensmittel in den Darm, der natürliche Infektionsort. Die Besonderheit von *Listeria monocytogenes* liegt in der Fähigkeit, ihre Aufnahme in das Zytoplasma der Körperzellen zu induzieren und sich dann intrazellulär im Organismus zu verbreiten. Durch diese zytoplasmatische Verbreitung unterwandern sie die humorale Immunabwehr und überwinden die Blut-Hirn- oder die Plazentaschranke, so dass sie beim Menschen u.a. Meningitis, Meningoenzephalites und Fehlgeburten hervorrufen können (Schlech III, 2000).

1.4.2 Der Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Von den meisten anderen pathogenen Bakterien unterscheidet sich *Listeria monocytogenes* durch die zytoplasmatische Verbreitung (Theriot, 1995, Cossart and Bierne, 2001). Listerien induzieren ihre eigene Phagozytose auch in nicht-professionell phagozytierenden Zellen wie Epithelzellen oder Fibroblasten durch Expression der sog. Internaline (bildung 2a) (Tilney and Portnoy, 1989, Gaillard *et al.*, 1991, Dramsi *et al.* 1993, 1995, Lingnau *et al.*, 1995). Die Bakterien sind jetzt von der Membran des Phagosoms umgeben (bildung 2b). Durch die Sekretion des hämolytischen Listeriolysins wird diese Membran zerstört, so dass die Bakterien ins Zytoplasma gelangen (bildung 2c) (Gaillard *et al.*, 1986, Geoffroy *et al.*, 1987,

Kathariou *et al.*, 1987, Chakraborty and Goebel, 1988). Nach der ersten Teilung beginnen sie, getrieben von einem Schweif aus Aktinfilamenten, sich durch das Zytoplasma zu bewegen (bildung 2d) (Sanger *et al.*, 1992, Theriot *et al.*, 1992, Cossart and Kocks, 1994, Mogilney and Oster, 1996).

Die Bewegung erfolgt mit variabler Geschwindigkeit und ist ungerichtet. Dabei stoßen sie gegen die Zytoplasmamembran und bilden eine Membranausstülpung, mit der sie sich in benachbarte Zellen bohren und hier wiederum ihre Phagozytose induzieren (bildung 2e). Sie lysieren sowohl die Membran der alten Wirtszelle und die Lysosomenmembran der neuen Wirtszelle und gelangen so erneut in das Zytoplasma (bildung 2f, g).

Dieser Infektionszyklus kann sich nun beliebig oft wiederholen und ermöglicht den Listerien sich intrazellulär wahrscheinlich im gesamten Organismus zu verbreiten. Eine Immunreaktion kann deshalb nicht durch frei zirkulierende Antikörper, sondern nur durch das zelluläre Immunsystem ausgelöst werden, das prozessierte Listerienpeptide auf der Oberfläche infizierter Zellen erkennen kann. Die rechtzeitige Ausbreitung in neue Wirtszellen kann sie aber auch dieser Komponente des Immunsystems entziehen (Cossart and Portnoy, 2000).

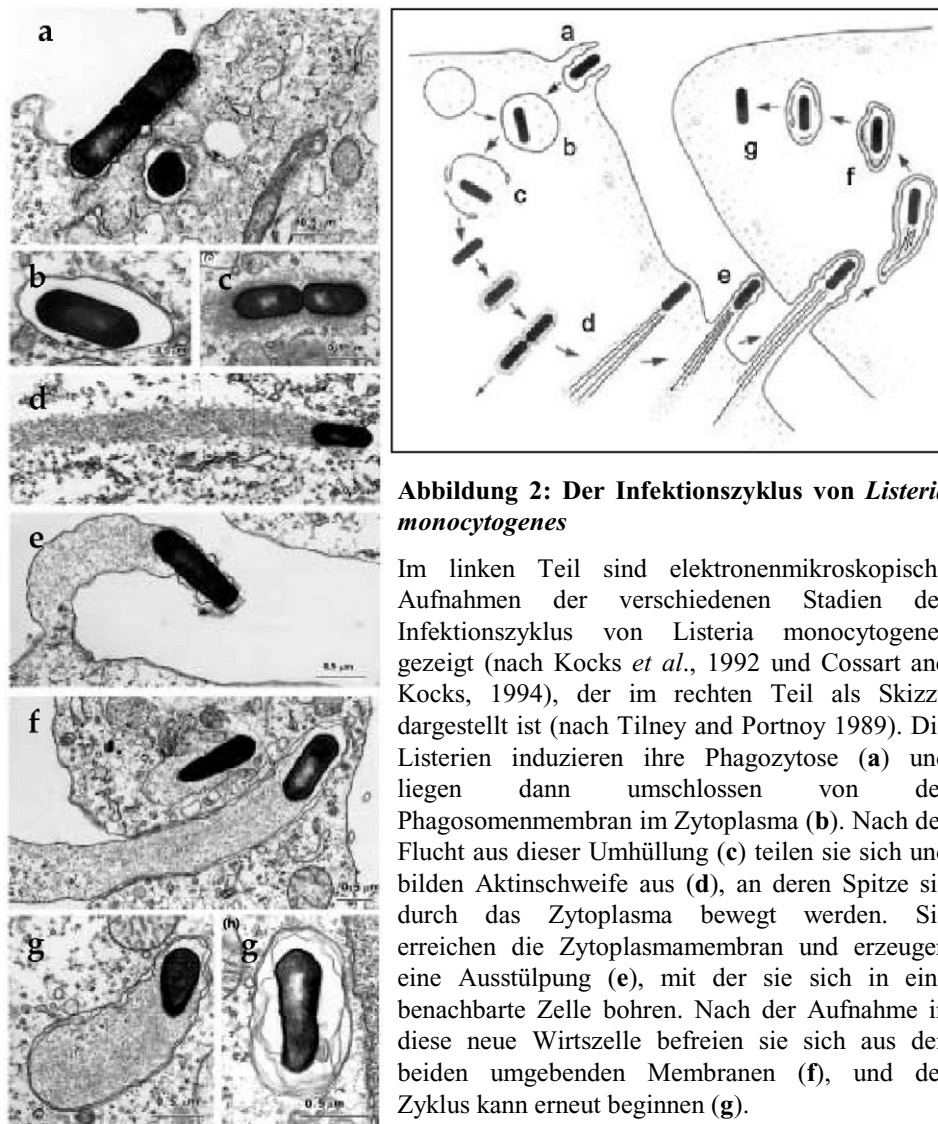


Abbildung 2: Der Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Im linken Teil sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Stadien des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* gezeigt (nach Kocks *et al.*, 1992 und Cossart and Kocks, 1994), der im rechten Teil als Skizze dargestellt ist (nach Tilney and Portnoy 1989). Die Listerien induzieren ihre Phagozytose (a) und liegen dann umschlossen von der Phagosomenmembran im Zytoplasma (b). Nach der Flucht aus dieser Umhüllung (c) teilen sie sich und bilden Aktinschweife aus (d), an deren Spitze sie durch das Zytoplasma bewegt werden. Sie erreichen die Zytoplasmamembran und erzeugen eine Ausstülpung (e), mit der sie sich in eine benachbarte Zelle bohren. Nach der Aufnahme in diese neue Wirtszelle befreien sie sich aus den beiden umgebenden Membranen (f), und der Zyklus kann erneut beginnen (g).

1.4.3 Aktin-vermittelte Listerienmotilität

Nach der Internalisierung und dem Entkommen aus dem Phagosom befinden sich die Listerien stationär im Zytoplasma. Die Anfärbung von F-Aktin mit Phalloidin zeigt, dass diese stationären Listerien von einer “Wolke” aus Aktinfilamenten eingehüllt werden. Die erste Teilung induziert dann eine Polarität, die dazu führt, dass sich die Aktinfilamente am älteren Zellpol konzentrieren, während sie in Richtung des neu gebildeten Pols kontinuierlich abnehmen. Man spricht von einer gradientartigen Verteilung mit einem Maximum am älteren Zellpol. An diesem Pol bilden sich weitere Aktinfilamente, und das Listerium setzt sich in entgegengesetzter Richtung in Bewegung. Dieser “Kometenschweif” aus Aktinfilamenten bleibt stationär im

Zytoplasma, während an der Polymerisationszone neue Filamente gebildet werden und, am Schweifende Aktin depolymerisiert. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist ein direktes Maß der Aktinpolymerisationsrate und korreliert, zumindest bei konstanter Geschwindigkeit und konstanter Depolymerisation, mit der Schweiflänge (Sanger *et al.*, 1992, Theriot *et al.*, 1992).

1.4.4 ActA

Der einzige listerielle Virulenzfaktor, der die Ausnutzung des Mikrofilamentsystems der Wirtszelle zur Erzeugung der Aktin-vermittelten Listerienmotilität ermöglicht, ist das ActA (Aktin Nukleationsfaktor). Listerienmutanten, die kein ActA exprimieren, sind nicht motil. Sie bilden innerhalb der infizierten Zelle Kolonien und können sich nicht ausbreiten. Allein die lokale Expression von ActA an der Plasmamembran, an Mitochondrien oder an nicht motilen Listerienarten bewirkt Aktinpolymerisationsprozesse (Domann *et al.*, 1992, Pistor *et al.*, 1994, 1995, Friedrich *et al.*, 1995, Kocks *et al.*, 1995, Lasa *et al.*, 1995).

Im Aminoterminus von ActA liegen für die Listerienmotilität essentielle Motive (Abbildung 3). Sie vermitteln eine Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (s. 1.3.2) und interagieren mit Aktinmonomeren und möglicherweise mit Aktinfilamenten, wodurch die Aktinfilamentnukleation induziert wird (Friederich *et al.* 1995, Lasa *et al.*, 1995, 1997, Pistor *et al.*, 1995, Welch *et al.*, 1998, Pistor *et al.*, 2000, Zalevsky *et al.*, 2001, Skoble *et al.*, 2000). Der Arp2/3-Komplex lokalisiert entsprechend an der Polymerisationszone aber auch, als Filament-vernetzendes und “pointed end-capping“ Protein, im Schweif der motilen Listerien. Mutationen in der aminoterminalen ActA-Domäne verhindern die Arp2/3-Rekrutierung und Aktinnukleation an der Listerienoberfläche (Pistor *et al.*, 1995, 2000, Lasa *et al.*, 1997).

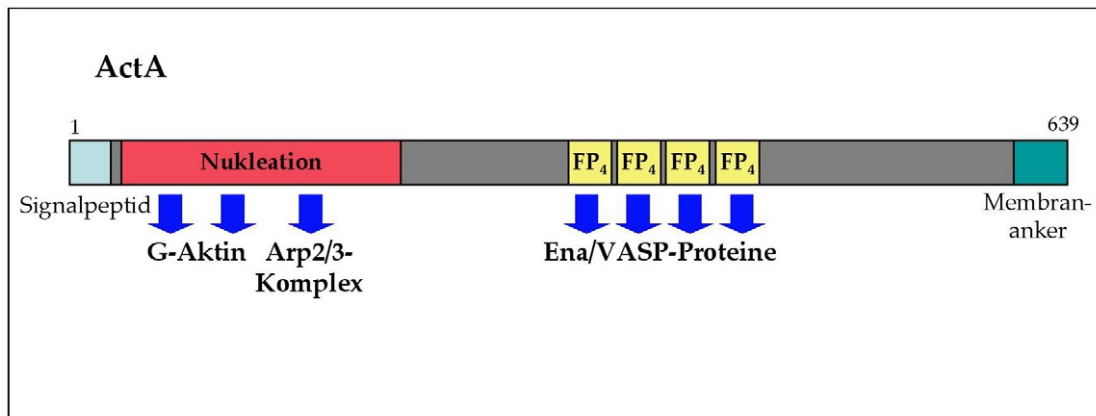


Abbildung 3. ActA

Das Schema von ActA zeigt das Signalpeptid am Aminoterminal, die aminoterminalen Nukleationsdomäne, die die Aktinfilamentnukleation durch Bindung von G-Aktin und dem Arp2/3-Komplex induziert, die vier zentralen FP₄-Motive, die Ena/VASP-Proteine rekrutieren und dadurch die Aktinfilamentelongation fördern, und den carboxyterminalen Membrananker.

Vier zentrale FP₄-Motive (s. 1.3.7) können Ena/VASP-Proteine über deren EVH1-Domäne rekrutieren (Pistor *et al.*, 1994, 1995, Chakraborty *et al.*, 1995, Gertler *et al.*, 1996, Niebuhr *et al.*, 1997). Eine neue Studie zeigt, dass die vier FP₄-Motive simultan vier EVH1-Domänen mit gleich großer Affinität rekrutieren können (Machner *et al.*, 2001, zur Publikation eingereichtes Manuskript). Listerienmutanten, die ein ActA mit deletierten Prolin-reichen Regionen exprimieren, können die Ena/VASP-Proteine nicht mehr rekrutieren, bilden nur kurze Schweife und sind nur im geringen Maße motil. Die Ena/VASP-Rekrutierung ist also nicht essentiell, jedoch maßgeblich für die Effizienz der Listerienmotilität (Pistor *et al.*, 1995, Smith *et al.*, 1996, Niebuhr *et al.*, 1997).

1.5 Listerienmotilität und zelluläre Mikrofilamentdynamik

Durch die Rekonstitution der Listerienbewegung mit aufgereinigten Proteinen wurden weitere zelluläre Faktoren der Listerienmotilität neben Aktin, dem Arp2/3-Komplex und Ena/VASP-Proteinen identifiziert. Das von den Ena/VASP-Proteinen rekrutierte Profilin steigert die Listeriengeschwindigkeit, ist jedoch wie sie nicht essentiell für die Listerienmotilität (s. auch 1.3.6). Cofilin und das “capping-protein“ sind notwendig, um die Polymerisation und Depolymerisation des Schweifes zu regulieren. Das

Aktinfilament bündelnde Protein α -Aktinin fördert zusätzlich die Listerienmotilität, indem es die Filamente im Schweif vernetzt und so dessen Struktur beeinflusst (Loisel *et al.*, 1999).

Auf diesen Erkenntnissen basiert das folgende Modell der Listerienmotilität (Abbildung 4): Das ActA interagiert mit Aktin und dem Arp2/3-Komplex, was zur Nukleation von Aktinfilamenten in der Polymerisationszone führt und so eine geringe Motilität erzeugt. ActA rekrutiert Ena/VASP-Proteine, die wiederum Profilin:Aktin-Komplexe rekrutieren. Die Aktinmonomere dissoziieren vom Profilin und verlängern effektiv die nukleierten Filamente, so dass eine wesentlich gesteigerte Motilität zustande kommt (Cameron *et al.*, 2000).

Listerien gelingt es durch die Expression des ActA die zelluläre Regulation des Mikrofilamentsystem zu umgehen und die vorhandenen Faktoren für ihre eigene Verbreitung zu nutzen. Sowohl die Nukleation als auch die Elongation von Aktinfilamenten werden durch das ActA integriert (Tilney and Portnoy, 1989, Higley and Way, 1997, Dramsi and Cossart, 1998, Ebel *et al.*, 1999, Loisel *et al.*, 1999, Mounier *et al.*, 1999).

Die Zelle exprimiert die Proteine Vinculin, Zyxin, Fyb/SLAP, WASP, N-WASP und Scar, die ActA-Analoga Domänen enthalten. Im Gegensatz zu ActA besitzen diese Analoga aber auch Motive, die eine Regulation ihrer Aktivität ermöglichen.

Die Proteine Zyxin und Vinculin lokalisieren an Stressfasern und “focal adhesions” und sind hier in die temporale und zeitliche Regulation der Aktinpolymerisation involviert (Jockusch *et al.*, 1995, Beckerle, 1997, 1998). Fyb/SLAP lokalisiert in Lamellipodien und spielt eine Rolle in der T-Zell Aktivierung (Krause *et al.*, 2000). Alle drei Proteine interagieren wie ActA mit Ena/VASP-Proteinen.

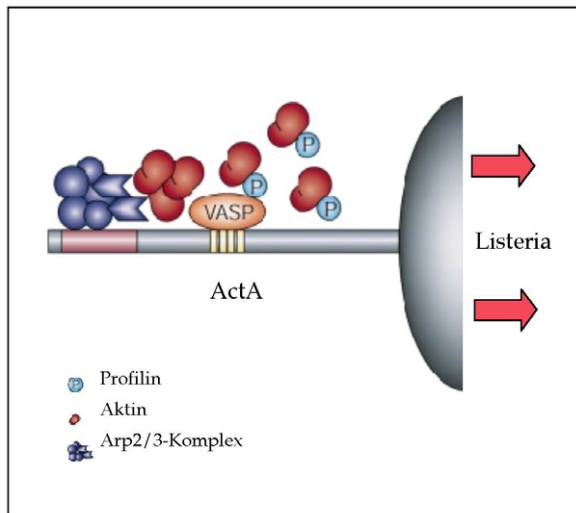


Abbildung 4: Modell der intrazellulären Listerienmotilität

In dieser Skizze sind die Ereignisse an der Polymerisationszone motiler Listerien dargestellt, die zur Filamentbildung und damit zum Vortrieb des Bakteriums führen. Das auf der Zellwand exponierte ActA rekrutiert und aktiviert den Arp2/3-Komplex und interagiert mit Aktin durch die aminoternale Domäne, so dass Aktinfilamente nukleiert werden, deren "pointed ends" durch den Arp2/3-Komplex geschützt werden. Die zentralen FP₄-Motive des ActA rekrutieren Ena/VASP-Proteine, die wiederum Profilin:Aktin-Komplexe rekrutieren. Das Aktin polymerisiert an dem freien "barbed end", so dass das Filament verlängert wird (nach Cameron *et al.*, 2000).

Die Proteine der WASP-Familie WASP, N-WASP, Scar, Bee1p besitzen, neben vielfältigen Regulationsmechanismen, zum ActA analoge Arp2/3-Komplex- und G-Aktin-Interaktionsdomänen. Entsprechend können sie die Mikrofilamentnukleation induzieren (Machesky *et al.*, 1999, Rohatgi *et al.*, 1999, Winter *et al.*, 1999, Yasar *et al.*, 1999).

Während das ActA also alle für die Listerienmotilität relevanten Funktionen in sich vereinigt, müssen die zellulären Analogen gemeinsam interagieren, um dieselben Funktionen erfüllen zu können und werden zudem selbst in ihrer Aktivität reguliert.

Neben Listerien bewegen sich auch *Shigella flexneri* und *Vaccinia* Viren, getrieben durch die Aktinpolymerisation, durch ihre Wirtszellen. Auch sie exprimieren an ihrer Oberfläche Proteine, die wie ActA Wirtszellfaktoren rekrutieren. Shigellen exponieren das IcsA und rekrutieren damit einen Komplex aus N-WASP, WIP, Nck. Dieser Multiligandenkomplex kann wahrscheinlich wie ActA sowohl die Arp2/3 vermittelte Filamentnukleation induzieren als auch durch Rekrutierung von Profilin:Aktin die Filamentelongation fördern. Die *Vaccinia* Viren verwenden ebenso diesen Multiligandenkomplex aus Wirtszellproteinen der von dem *Vaccinia* Protein A36R rekrutiert wird (Abbildung 5) (Frischknecht and Way, 2001). Ein ähnlicher Multiligandenkomplex ist während der T-Zell Aktivierung an der Reorganisation des Mikrofilamentsystems beteiligt (Krause *et al.*, 2000).

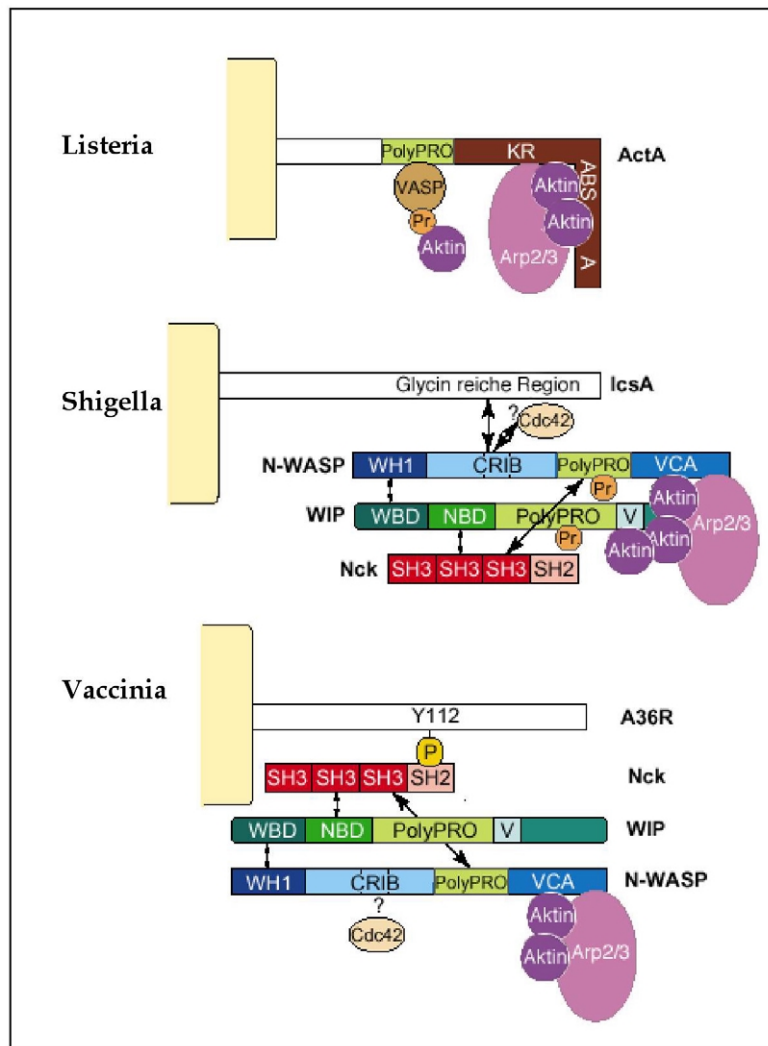


Abbildung 5: Vergleich der intrazellulären Motilität von Listerien, Shigellen und Vaccinien

Die Skizze zeigt, welche Wirtszellproteine von den Virulenzfaktoren der Listerien (ActA), Shigellen (IcsA) und Vaccinia (A36R) rekrutiert werden, so dass sie Aktinschwänze bilden und durch sie durch das Zytoplasma bewegt werden. Shigellen und Vaccinien können nicht wie Listerien direkt die Filamentnukleation und -elongation auslösen, sondern rekrutieren dazu einen Multiligandenkomplex aus N-WASP, Nck und WIP (nach Frischknecht and Way, 2001).

Auch das Bakterium *Rickettsia conorii* bewegt sich an der Spitze von Aktinschwänzen durch Zellen (Gouin *et al.*, 1999, Heinzen *et al.*, 1999), und es gibt Hinweise, dass auch kleine zelluläre Vesikel wie Pinosomen oder Endosomen auf derartige Aktin-vermittelte Bewegungsmechanismen zurückgreifen (Merrifield *et al.*, 1999).

Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) und Salmonellen dringen zwar nicht in das Zytoplasma von Zellen ein, können aber ebenfalls durch Virulenzfaktoren das Mikrofilamentsystem ihrer Wirtszellen von außen oder aus einem Phagosom heraus steuern. Auch sie verwenden dazu weitgehend die vorhandenen Mikrofilamentsystemkomponenten (Frischknecht and Way, 2001).

Mikroskopische Analysen der Aktinfilamentorganisation im Listerienschwanz und in Lamellipodium offenbarten grundlegende Gemeinsamkeiten bezüglich der Filamentausrichtung, -verzweigung und -bündelung (Abbildung 6) (Zhukarev, 1995, Sechi *et al.*, 1997, Gouin *et al.*, 1999, Svitkina and Borisy, 1999). Auch die

Untersuchung der Aktindynamik in diesen zellulären Strukturen zeigt Ähnlichkeiten zu der listeriellen Bewegung (Mallavarapu and Mitchison, 1999). In den Schweifen finden sich außerdem Mikrofilament-organisierende Proteine wie α -Aktinin, Fimbrin, Villin und Ezrin, die beispielsweise auch in Mikrovilli vorkommen (Temmm-Grove *et al.*, 1994).

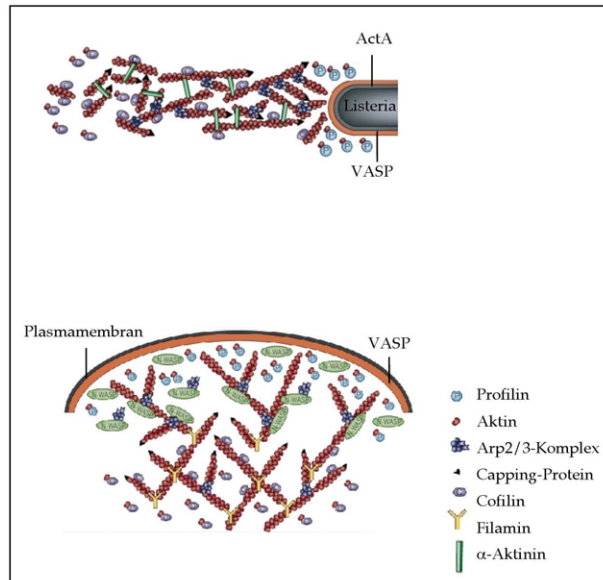


Abbildung 6: Vergleich der Mikrofilamentorganisation in Lamellipodien und Listerischweifen

In dieser Skizze sind die Gemeinsamkeiten der Mikrofilamentstrukturen in Listerischweifen und in Lamellipodien dargestellt. In beiden Fällen beginnt die Polymerisation in einer Polymerisationszone (orange) entlang der Plasmamembran bzw. Listerienzellwand. In ihr sind die “barbed ends” der Filamente eingebettet. Ena/VASP-Proteine lokalisieren hier und fördern durch die Rekrutierung von Profilin:Aktin-Komplexen die Filamentelongation, die das Bakterium oder das Lamellipodium in die entgegengesetzte Richtung schiebt. Die Filamente werden durch den Arp2/3-Komplex am “pointed end” und durch das “capping-protein” am “barbed end” geschützt, sobald dieses die Polymerisationszone verlässt. Der Arp2/3-Komplex verzweigt, und Filamin oder α -Aktinin bündeln die Filamente. Die Depolymerisation wird durch Cofilin gefördert, das die Filamente schneidet und an ADP-Aktin binden kann (nach Cameron *et al.*, 2000).

Intrazelluläre Pathogene verwenden also nicht nur die beschriebenen zellulären Faktoren bzw. exprimieren deren Analoge, auch morphologisch sind deren Schweifstrukturen mit der Filamentorganisation in Lamellipodien oder Filopodien vergleichbar. Die intrazelluläre Motilität von Listerien, Shigellen, Ricketsien und dem Vaccinia Virus können deshalb als Modellsysteme der Mikrofilamentorganisation der Zelle angesehen werden.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die beschriebenen Studien zeigten, dass Profilin und Ena/VASP-Proteine miteinander interagieren können und eine Rolle in der Mikrofilamentregulation spielen. Die Eigenschaften von Profilin wurden *in vitro* bereits ausführlich untersucht. Wenig war

jedoch über dessen subzelluläre Lokalisation und insbesondere über dessen Dynamik *in vivo* bekannt. Auch die Ena/VASP-Proteine, speziell die ActA-EVH1-Interaktion, wurden *in vitro* bereits intensiv analysiert. Es mangelte jedoch an Informationen über die Funktionen der zentralen und der EVH2-Domäne sowie über die Bedeutung der Phosphorylierung *in vivo*.

In dieser Arbeit sollte deshalb mit dem Modellsystem der intrazellulären Listerienmotilität die Funktionen von Profilin und Ena/VASP-Proteinen in der Mikrofilamentdynamik untersucht werden. Es sollte insbesondere analysiert werden, ob und wie Profilin und Ena/VASP-Proteine in der Listerienmotilität gemeinsam interagieren und welche anderen Funktionen der Ena/VASP-Domänen und Phosphorylierungen *in vivo* relevant sind.

Hierzu mussten zuerst GFP-markierte Profilin- und Ena/VASP-Fusionsproteine hergestellt und charakterisiert werden. Die Verwendung unterschiedlicher Ena/VASP-Mutanten sollte die isolierte Untersuchung verschiedener Proteinfunktionen ermöglichen. In *Listeria monocytogenes* infizierten Zellen exprimiert und in videomikroskopischen Untersuchungen eingesetzt, sollten die Parameter Lokalisation und Fluoreszenzintensität sowie die Listeriengeschwindigkeit analysiert werden.

Die Kombination dieser Ergebnisse mit denen aus den dargestellten früheren Studien sollte helfen, die für die Mikrofilamentdynamik *in vivo* maßgeblichen Funktionen von Ena/VASP-Proteinen und Profilin aufzuklären.

2 MATERIAL UND METHODEN

Alle beschriebenen Methoden basieren, wenn nicht besonders gekennzeichnet, auf Standardverfahren (Sambrook *et al.*, 1989, Spector *et al.*, 1998, Harlow and Lane, 1999).

2.1 Materialien

Die verwendeten Substanzen der Firmen Amersham, Applied Biosystems, Biorad, Boehringer Mannheim, Difco, Flow Laboratories, Fluka, Gibco BRL, Hoechst, Merck, Millipore, MoBiTec, New England Biolabs, Perkin Elmer, Pharmacia, Promega, Qiagen, Riedel de Haën, Renner, Roche, Roth, Serva, Sigma und USB hatten sofern nicht anders angegeben die Reinheitsgrade "p.a.", "reinst." bzw. "für mikrobielle Medien". Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde.

Alle Bakterienkulturmedien wurden autoklaviert (30 min, 121 °C) und Zellkulturmedien sterilfiltriert (0,22 µm). Antibiotika und andere temperaturempfindliche Komponenten wurden ebenfalls sterilfiltriert und zum kühlen, sterilen Medium hinzugegeben.

2.2 Bakterienkultur

Alle verwendeten Bakterien entstammen Glyzerinstammkulturen, die bei -80 °C gelagert wurden. Sie wurden auf Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C maximal vier Wochen gelagert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 16 g Bacto-Agar in 1 l Medium eingewogen, aufgekocht und handwarm in Petrischalen gegossen. Zur Vermehrung eines Klons wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte in 5 ml Kulturmedium überimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (G25, New Brunswick, USA) bei 37 °C und 180 UpM kultiviert. Großkulturen wurden von diesen Minikulturen als 1000- bis 5000- fache Verdünnung in Erlenmeyerkolben ohne Schikane angesetzt.

2.2.1 *Escherichia coli*

Die Klonierung von Plasmiden wurde in *Escherichia coli* TG 2 (supE hsdD5 thi D(lac-proAB) D(srl-recA)306::Tn10(tetR)/F'(traD36 proAB+lacIIacZDM15)) durchgeführt, nur für das TOPO-Cloning wurde *Escherichia coli* TOP10F'(F'(lacIqTn10(TetR)) mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG) verwendet, da diese eine blau-weiß Selektion auf Einbau des Inserts erlauben. Die Bakterien wurden in LB-Medium (Luria-Bertani broth: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 120 mM NaCl) bzw. auf LB-Agarplatten kultiviert. Sollte während der Kultur auf transgene Plasmide mit Antibiotikaresistenz selektiert werden, so wurde das entsprechende Antibiotikum 1000-Fach verdünnt aus einer Stammlösung dem Medium zugegeben.

1000 x Ampicillin Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin G in Wasser

1000 x Kanamycin Stammlösung

50 mg/ml Kanamycin in Wasser

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

In dieser Arbeit wurden der schwach hämolytische *Listeria monocytogenes* EGD Wildtyp Stamm (Serotyp 1/2) sowie die isogene Listeria Mutante *Listeria monocytogenes* Δ ActA5, die eine ActA Deletionsmutante ohne die zentralen Prolinreichen Regionen exprimiert (Domann *et al.*, 1992, Niebuhr *et al.*, 1997), verwendet. Die Bakterien wurden in 37 g/l Brain-Heart-Infusion (BHI-Medium, Difco Laboratories) geschüttelt kultiviert oder auf BHI-Agarplatten (16 g Bakto-Agar wurden in 1 l BHI-Medium) ausgestrichen.

2.3 Molekulare Gentechnik

2.3.1 Plasmide

Für die Klonierungen in dieser Arbeit wurden die folgenden Plasmide verwendet:

| | | |
|--------------------|----------------|---|
| pEGFP-N1 | Clontech | Fusionsproteine mit carboxyterminalen GFP |
| pEGFP-C2 | Clontech | Fusionsproteine mit aminoterminalen GFP |
| pEYFP-N1 | Clontech | Fusionsproteine mit C-terminalen YFP |
| pECFP-C1 | Clontech | Fusionsproteine mit N-terminalen CFP |
| pCR2.1-TOPO | Invitrogen | TOPO-TA Klonierung |
| pET-28 | Novagen | Proteinexpression in E. coli |
| pMSCV | Clontech | Retroviraler Gentransfer |
| pCR ² X | pMSCV Derivat* | Retroviraler Gentransfer |

Tabelle 1: Plasmide

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird in einer automatisierten *in vitro* Reaktion ein definierter DNA Abschnitt exponentiell amplifiziert. Die Enden dieses DNA-Stranges werden von synthetisch hergestellten Oligonukleotid-Primern definiert.

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer (Gibco BRL und MWG-Biotech) wurden wenn möglich so gestaltet, dass sie mindestens mit ca. 20 Nukleotiden am “template“ hybridisieren, einen GC-Gehalt von etwa 50 % aufweisen, an dem 3’-Ende mit zwei Gs oder Cs abschließen und sich die Primerpaare in ihrer theoretischen Schmelztemperatur nur wenig unterscheiden.

Ein Zyklus der PCR-Reaktion besteht aus dem Denaturieren des “template“ bei 94°C, dem Hybridisieren der Oligonukleotide bei niedrigerer Temperatur von 70-50 °C und der Kettenverlängerung bei 72 °C durch eine hitzstabile DNA-Polymerase. Die Produkte der vorherigen Reaktion dienen jeweils wieder als “template“ in den folgenden Zyklen.

Es wurde Pfu-Polymerase mit “proofreading“-Eigenschaft verwendet, um die

* von Jim Bear (Massachusetts Institute of Technology (MIT), Boston MA, USA) zur Verfügung gestellt.

Wahrscheinlichkeit des Auftretens unerwünschter Mutationen zu minimieren.

Da sich die Hybridisierungstemperatur, vor allem bei der Arbeit mit “mismatch“-Primern, nur ungenau voraussberechnen lässt, wurde die sog. “touchdown“-PCR Technik verwendet, bei der während der ersten Zyklen die Hybridisierungstemperatur um 0,5 - 1 °C/Zyklus verringert wurde. Zu Beginn der Reaktion herrschten somit möglichst stringente Hybridisierungsbedingungen, wodurch die Amplifizierung des gewünschten Produkts favorisiert wurde. Auch bei später sinkender Stringenz überwiegt aufgrund der vergrößerten “template“-Anzahl die Produktion des benötigten Fragments.

PCR-Ansatz

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| dest. Wasser | ad. 50 µl |
| 10 x cloned Pfu-buffer (Stratagene) | 5 µl |
| dNTP-Mix (Takara) | 200 µM |
| “template“-DNA | 1-100 ng |
| vorwärts Primer | 200 nM |
| rückwärts Primer | 200 nM |
| Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene) | 0,5 U |

Reaktionsschema

| | | |
|---|---|------|
| 1 | 95 °C, 3 min | 1 x |
| 2 | 95 °C, 1 min > 68 °C, -1 °C/ Zyklus, 1 min > 72 °C, 3 min | 15 x |
| 3 | 95 °C, 1 min > 53 °C, 1 min > 72 °C, 3 min | 10 x |
| 4 | 72 °C, 10 min | 1 x |

Bei Bedarf wurde der Temperaturunterschied pro Zyklus verringert und die Hybridisierungstemperaturen entsprechend angepasst.

2.3.3 Mutagenese der Enden von Genen

Für viele Klonierungen mussten an den Enden eines “open reading frame“(ORF) Restriktionsschnittstellen generiert werden. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die “mismatches“ am 5‘-Ende enthielten, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen während der PCR einführten. Diese Mutagenese beeinflusst nicht den ORF des amplifizierten Gens. Gleichzeitig konnten Stop-“codons“ vernichtet werden, um die durchgehende Translation von Fusionsproteinen zu ermöglichen.

2.3.4 Gerichtete Deletionsmutagenese

Zur Durchführung von Deletionsmutagenesen wurde die “overlap-extension PCR“ verwendet (Abbildung 7). Zuerst wurden in zwei getrennten PCR Ansätzen der für den Amino- und für den Carboxyterminus eines Proteins kodierende ORF amplifiziert. Die internen Primer, die den zu deletierenden Abschnitt eingrenzen, bestanden aus ca. 30 Nukleotiden. Die 3'-Hälfte des internen Primer hybridisierte an das “template“, während die 5'-Hälfte der komplementären Sequenz des jeweils anderen internen Primers entsprach und so ein überhängendes Ende bildete. Die beiden Produkte wurden im Agarosegel aufgereinigt und bildeten in einer zweiten PCR ein Fusions-“template“, indem die überhängenden, komplementären Enden der internen Primer hybridisierten. In dieser zweiten Reaktion wurden “nested“-Primer verwendet, so dass jetzt das Gen mit der gewünschten Deletion amplifiziert wurde. Mit den “nested“-Primern konnten gleichzeitig benötigte Restriktionsschnittstellen eingeführt werden.

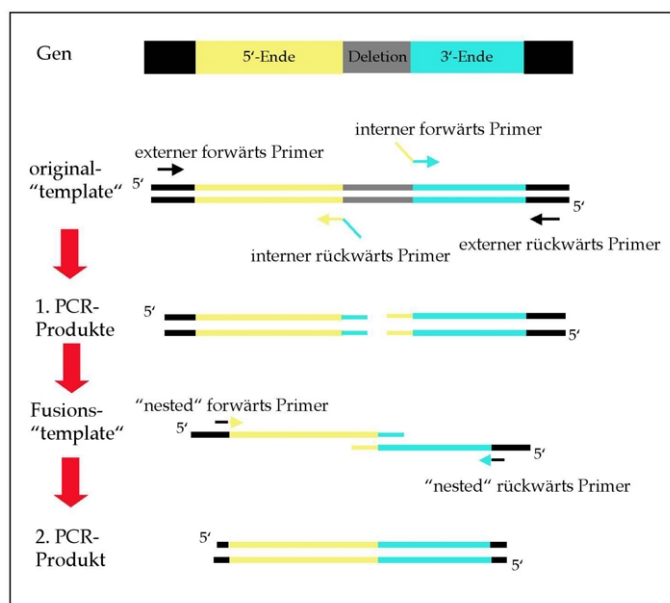


Abbildung 7: “overlap-extension“-PCR

Durchführung einer Deletion mittels “overlap-extension“-PCR: Der zu deletierende Bereich (grau) wird von dem 5'-Ende und vom 3'-Ende des ORFs flankiert. Dieser ORF wird in einer ersten PCR-Runde als “template“ verwendet, in der das 5'-Ende und das 3'-Ende getrennt amplifiziert werden. Hierzu werden die externen und internen vorwärts und rückwärts Primer verwendet. Nach der Aufreinigung beider Produkte werden sie in der zweiten PCR-Runde als Fusions-“template“ eingesetzt. Hier können jetzt die überhängenden Enden, die durch die internen Primer erzeugt wurden, miteinander hybridisieren. Als Endprodukt erhält man den Deletions-ORF.

2.3.5 Gerichtete Punktmutagenese

Zur Mutagenese einzelner Nukleotide innerhalb eines ORF, die zu einem Aminosäureaustausch führen, wurde der QuikChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kit (Stratagene) verwendet. In einer PCR-Reaktion hybridisierten zwei komplementäre,

ca. 35 Nukleotide lange Oligonukleotide, welche die neue gewünschte Sequenz in der Mitte tragen, am “template“. Dabei handelte es sich um einen ORF innerhalb eines zirkulären Plasmids sein. Die Oligonukleotide waren so die Startpunkte der Amplifikation des gesamten Plasmids und wurden ein Teil der neu entstehenden Plasmide. Um die nicht mutierten parentalen Plasmide abzubauen, wurde nach der PCR ein Restriktionsverdau mit DpnI durchgeführt. DpnI kann nur methylierte DNA schneiden und erkennt deshalb die aus *E. coli* stammenden methylierten parentalen Plasmide. Die übrig gebliebenen neuen Plasmide, die die gewünschte Mutation trugen, wurden in *E. coli* transformiert und dadurch amplifiziert.

2.3.6 cDNA-Klonierung

Zur Klonierung von cDNA aus Gewebekulturzellen wurde deren RNA isoliert, in einer Reversen-Transkriptase-Reaktion von der mRNA einsträngige DNA-Kopien hergestellt und schließlich mit genspezifischen Primern der gewünschte ORF in einer PCR-Reaktion amplifiziert.

Zur Isolation der gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen wurden die Zellen auf einer 10 cm Platte bis zu 90 % Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen durch Abkratzen und Pipetieren in 3 ml TRIzol (Gibco BRL) suspendiert. Das TRIzol Reagenz lysiert die Zellmembranen und setzt die RNA frei. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 600 µl Chloroform hinzugegeben, 15 sek geschüttelt, weitere 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Probe mit 12000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Es bildete sich eine untere organische und eine obere wässrige Phase aus, die abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert wurde. Die enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur ausgefällt und durch Zentrifugieren mit 12000 x g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 µl DEPC-Wasser (Wasser mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat) gelöst und bei -80 °C gelagert.

Die Erststrangsynthese wurde mit dem SuperScript-Preamplification-System (Gibco BRL) nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1 µl der präparierten gesamt-RNA und Oligo (dT)₁₈-Primer verwendet.

Von diesem Ansatz wurden 2 µl als “template“ in der PCR mit den genspezifischen

Primern eingesetzt, um die gewünschte cDNA herzustellen.

2.3.7 TOPO-TA-Cloning

Um bei Bedarf auch sehr geringe Mengen von PCR-Produkten zu sichern und in *E. coli* amplifizieren zu können, wurden sie in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert. Dieser linearisierte Vektor besitzt 3'-überhängende Deoxythymidine, die mit den Deoxyadenosinen hybridisieren, die durch die terminale Transferaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase an die an die 3'-Enden der PCR-Produkte angehängt werden konnten. Hierzu wurde nach der eigentlichen PCR Taq-Polymerase (Mobitec) zugesetzt und bei 72 °C für 15 min inkubiert. Die sehr effiziente Ligation erfolgte durch eine an den Vektor gekoppelte Topoisomerase. Der Ansatz wurde in *E. coli* TOP 10 F' transformiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

2.3.8 DNA-Agarosegelelektrophorese

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese wurden doppelsträngige, linearisierte DNA-Fragmente entsprechend ihrer Nukleotidanzahl nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern dabei, getrieben durch ein elektrisches Feld, durch eine Agarosegelmatrix, so dass die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe verzögert werden. Zugegebenes Ethidiumbromid interkaliert in der DNA-Doppelhelix und markiert sie durch Fluoreszenz bei UV-Anregung. Die Größe der DNA-Fragmente wird durch Vergleich mit einem parallel aufgetrennten DNA-Größenmarker ermittelt.

SeaKem LE Agarose wurde zu TAE-Puffer gegeben (Endkonzentration 0,8 – 1,5 %) und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sämtliche Agarose aufgelöst war. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromidlösung (Roth) zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben und die Agaroselösung in einen Gelträger mit Kamm (Biorad) gegossen.

Nach dem Abkühlen wurde das Gel in die Gelkammer (Biorad) gelegt und diese mit TAE-Puffer gefüllt, so dass das gesamte Gel gerade bedeckt war. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5 x Stop-Puffer vermischt und geladen. Die Smart-ladder (Eurogentech) wurde zur Größenbestimmung und Abschätzung der DNA-Konzentration verwendet. Das Gel wurde dann mit 10 V/cm Gellänge gefahren, bis

eine ausreichende Bandentrennung erreicht ist.

50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

| | |
|-----------|-------|
| Tris Base | 2 M |
| Na-Acetat | 1 M |
| EDTA | 50 mM |
| pH 7,5 | |

5 x DNA-Stop-Puffer

| | |
|-----------------|--------------|
| 50 x TAE-Puffer | 20 ml |
| EDTA | 50 mM |
| SDS | 0,4 % (w/v) |
| Ficoll | 15 % (w/v) |
| Bromphenolblau | 0,05 % (w/v) |
| pH 8,0 | |

2.3.9 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA-Moleküle an enzymespezifischen, palindromartigen Erkennungssequenzen und hinterlassen glatte Enden ("blunt ends") oder Enden mit überhängender einzelsträngiger DNA ("sticky ends").

Die Reaktionen wurden mit Enzymen der Firma NEB mit den jeweils empfohlenen Reaktionspuffern, Temperaturen und Enzymmengen über Nacht durchgeführt. Für unvollständige Spaltungen wurden nur 10 % der normalen Enzymmenge für 5-30 min verwendet.

2.3.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation eines mit nur einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase entfernt, so dass ein Schließen des Vektors nur durch den Einbau eines phosphorylierten Inserts möglich ist.

Hierzu wurde der Restriktionsansatz mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und 11 µl 10 x Phosphatasepuffer (Boehringer) sowie 1 U alkalische Phosphatase (Boehringer) zugesetzt. Der Ansatz wurde 0,5 h bei Raumtemperatur inkubiert, nochmals 1 µl alkalische Phosphatase hinzugegeben und für weitere 0,5 h inkubiert.

2.3.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige, linearisierte DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen und Restriktionsspaltungen wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel-Extraction-Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.12 Ligation

Die Ligation verknüpft DNA-Fragmente durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung miteinander. Besonders effektiv funktioniert dies, wenn die Enden durch komplementäre “sticky ends“ miteinander hybridisieren können. Durch Verwendung von Restriktionsenzymen, die verschiedene “sticky ends“ hinterlassen, lässt sich die Verknüpfungsrichtung der Fragmente steuern und Religationen verhindern.

Zur Vorbereitung der Ligation wurden der Vektor und das DNA-Fragment mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnitten und aufgereinigt. Die Konzentrationen wurden im Agarosegel abgeschätzt und ca. 100 ng Vektor und die dreifache Menge DNA-Fragment gemischt. 10-Fach Reaktionspuffer und T4-DNA-Ligase (Roche) wurden hinzugegeben und der Ansatz ü.N. bei 4 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatz lag zwischen 15 und 30 µl. Der komplette Ansatz wurde dann in chemokompetente *E. coli* transformiert.

2.3.13 Transformation in *E. coli*

Plasmide aus einer DNA-Präparation oder einer Ligation wurden in chemokompetente *E. coli* TG2 transformiert und durch sie amplifiziert. Hierzu wurden chemokompetente *E. coli* hergestellt. Dieses Verfahren verändert die Bakterien derart, dass sie fremd-DNA binden und aufnehmen können.

1 l SOB-Medium mit Mg-Salzen wurden mit einer 10 ml *E. coli* ü.N. Kultur beimpft und geschüttelt bei 37 °C ca. 2,5 h bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ kultiviert. Diese logarithmisch wachsenden Zellen wurden durch Zentrifugation mit 5000 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert und das Pellet in 100 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation.

Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl-Lösung resuspendiert und die Suspension weitere 3 h auf Eis inkubiert. Zu diesen konzentrierten Bakterien wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10 % (v/v) gegeben und die Zellsuspension in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, dann erfolgte ein Hitzeschock für 30 sek im 42 °C warmen Wasserbad und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. 800 µl SOC-Medium wurden hinzugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37 °C geschüttelt inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf LB-Agarplatten ausplattiert, die ein dem transformierten Plasmid entsprechendes Antibiotikum enthielten, und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

SOB-Medium

| | |
|-------------------|--------|
| Bacto-Trypton | 20 g/l |
| Bacto-Hefeextrakt | 5 g/l |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 25 mM |

100 x Mg-Salze

| | |
|-------------------|-----|
| MgCl ₂ | 1 M |
| MgSO ₄ | 1 M |

100 x Glucose

| | |
|---------|-----|
| Glucose | 2 M |
|---------|-----|

SOC-Medium

SOB-Medium mit je 100facher Verdünnung von 100 x Mg-Salze und 100 x Glucose frisch ansetzen.

2.3.14 Plasmid-DNA Präparation

Plasmide wurden aus transformierten *E. coli* Kulturen mittels QIAGEN Plasmid-Prep-Kits nach Herstellerangaben (Mini-, Midi- oder Maxi-Kit Protokoll) präpariert.

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration wurde die optische Dichte bei 260

und 280 nm in einem Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) gemessen.

Dabei gilt:

$OD_{260} = 1$ entspricht 50 mg dsDNA/ml bei 1 cm Schichtdicke

$OD_{260} / OD_{280} = 1,8$ entspricht hochreiner DNA bei 1 cm Schichtdicke. Durch Verunreinigungen sinkt der Wert.

2.3.15 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das Sequenzier-System von Applied Biosystems verwendet.

Im Thermocycler wird von dem zu sequenzierenden “template“ in einem PCR ähnlichen Prozess von einem Primer ausgehende Kopien erstellt. Im Ansatz enthaltene Dideoxynukleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) führen zu zufällig auftretenden Kettenabbrüchen, da ihnen die für die Kettenverlängerung notwendige 3' OH-Gruppe fehlt. So entstehen Fragmente in jeder Länge mit einem Dideoxynukleotid am Ende. Jede Art Dideoxynukleotid ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass das zum Kettenabbruch führende Dideoxynukleotid identifiziert werden kann. Hierzu wird das entstandene DNA-Gemisch elektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Laser die Dideoxynukleotide zur Fluoreszenz angeregt. Die Emissionswellenlänge wird in Relation zur Elektrophoresezeit gesetzt und so ermittelt, in welcher Reihenfolge die Nukleotide angeordnet sind.

Reaktionsansatz

| | |
|---|-----------|
| “template“ | 1 µg |
| Primer | 3,2 pmol |
| BigDye RR Terminator AmpliTaq Premix (PE Applied Biosystems) | 4 µl |
| Wasser | ad. 10 ml |

Thermocycler-Programm

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | 96 °C, 15 sek > 55 °C, 15 sek > 60 °C, 4 min | 25x |
|---|--|-----|

Die Aufreinigung, Elektrophorese und Detektion wurde von GATC Biosystems

durchgeführt. Die Daten wurden mit DNA-Star Software (GATC Biosystems) ausgewertet.

2.4 Proteinbiochemie

2.4.1 Proteinextrakte

Zur Herstellung von Proteinextrakten zur Analyse im Western-Blot wurde die Zytoplasmamembran mit Igepal (Sigma) lysiert und so die zytoplasmatischen Proteine freigesetzt. Um einen proteolytischen Abbau und Dephosphorylierungen zu verhindern, wurde dem Lysispuffer Protease- und Phosphataseinhibitoren zugefügt und die Reaktion auf Eis durchgeführt.

Die Zellen wurden auf einer 10 cm Platte bis 90 % Konfluenz kultiviert, abtrypsinisiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die benötigte Menge wurde durch Zentrifugation mit 1000 UpM für 5 min bei 4 °C pelletiert, der Medienüberstand abgenommen und das Pellet in 100 µl eiskalten Lysispuffer aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation mit 13000 UpM für 1 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde für SDS-PAGE eingesetzt.

Lysispuffer

| | |
|--|----------------------|
| Tris-CL, pH 7,5 | 10 mM |
| NaCl | 150 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Igepal CA 630 (Sigma) | 1 % (v/v) |
| Na-Vanadat | 1 mM |
| Na-Fluorid | 10 mM |
| Protease Inhibitor (Complete Mini, Roche) | 1 Tablette auf 10 ml |

2.4.2 Bradford Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio Rad Protein Assay nach Bradford mit drei Parallelproben ermittelt. Proteinextrakte wurden 1:5 oder 1:10 verdünnt. Die Auswertung erfolgt im Elisareader (Spectromax, MWG-Biotech) mit SoftMaxPro Software (Molecular Devices Corp.).

2.4.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Zellproteinextrakte erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli. Die Gele konnten gefärbt oder für Western Blots benutzt werden.

Verwendet wurden Minigelapparaturen von Biometra (8,5 x 7,0 x 0,1 cm). Das polymerisierte Trenngel wurde mit einem Sammelgel überschichtet. Der Gellauf erfolgt in SDS-Laufpuffer mit konstant 120 V im Sammelgel und 160 V im Trenngel. Als Größenmarker wurde die 10 KD Ladder (Gibco BRL) verwendet. Die Proteinproben wurden vor der Auftrennung mit SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min bei 95 °C erhitzt.

Trenngel

| | |
|-----------------------|--|
| Wasser | ad. 7,5 ml |
| 1,5 M Tris-Cl, pH 8,8 | 1,5 ml |
| 10 % SDS | 60 µl |
| 30 % Acrylamid/Bis | je nach Trennbereich, so dass 7,5 bis 15 prozentige Gele entstehen |

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 8 µl TEMED und 12 µl 25 % APS gestartet.

Sammelgel

| | |
|-----------------------|--------|
| Wasser | 1,8 ml |
| 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8 | 320 µl |
| 10 % SDS | 25 µl |
| 30 % Acrylamid/Bis | 330 µl |

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 6 µl TEMED und 10 µl 25 % APS gestartet.

10 x SDS-Laufpuffer

| | |
|--------|-----------|
| Tris | 250 mM |
| Glyzin | 1,92 M |
| SDS | 1 % (w/v) |

4 x SDS-Probenpuffer

| | |
|-------------------|--------------|
| Tris-Cl, pH 6,8 | 25 mM |
| SDS | 4 % (w/v) |
| Glycerin | 10 % (v/v) |
| β-Mercaptoethanol | 4 % (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,01 % (w/v) |

Zur Färbung wurde das SDS-PAGE Gel wurde für 30 min in Coomassie Färbelösung geschwenkt und in Coomassie Entfärbelösung differenziert.

Coomassie Färbelösung

| | |
|--------------------------|-------------|
| Wasser | 65 % (v/v) |
| Isopropanol | 25 % (v/v) |
| Essigsäure (Eisessig) | 10 % (v/v) |
| Coomassie Brilliant Blue | 0,1 % (w/v) |

Coomassie Entfärbelösung

| | |
|-----------------------|------------|
| Wasser | 50 % (v/v) |
| Methanol | 40 % (v/v) |
| Essigsäure (Eisessig) | 10 % (v/v) |

Zur Aufbewahrung wurde das gefärbte Gel für 1h in 20 % Ethanol (v/v), 2 % Glycerin (v/v) in Wasser inkubiert und zwischen Zellophanfolien luftgetrocknet.

2.4.4 Western-Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im “semidryblot“-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Poly-Vinylidene-Di-Fluorid, Immobilon-P, Millipore) transferiert. Hierbei wandern die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf die positiv geladene Membran. Gel und Membran liegen dabei zwischen sechs Schichten Whatman-Papier, die wie auch Gel und Membran vorher in Blotpuffer getränkt wurden (die Membran wurde zuerst in Methanol aktiviert). Die verwendete Stromstärke betrug konstant $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche für eine Stunde.

Blotpuffer

| | |
|-----------|------------|
| Tris-Base | 50 mM |
| Glycin | 39 mM |
| SDS | 1,3 mM |
| Methanol | 20 % (v/v) |

2.4.5 Immunodetektion und Chemoluminiszenz

Zur spezifischen Detektion bestimmter geblotteter Proteine auf der PVDF-Membran wurden diese mit Antikörpern markiert.

Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C in Blocklösung zur Absättigung unspezifischer Bindungen geschwenkt. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur. Dieser wurde entweder als purer Hybridomazellüberstand oder verdünnt in Blocklösung eingesetzt (Tabelle 2). Dann wurde die Membran je 10 min mit TBS-T, TBS-T mit 0,5 M NaCl, TBS-T mit 0,5 % Triton-X100 (v/v) und TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der gegen den Primären gerichtet und mit Peroxidase gekoppelt war. Abschließend wurde die Membran wie zuvor gewaschen.

Die Membran wurde nun mit ECL-Substrat (Enhanced-Chemo-Luminescence, Amersham-Buchler) benetzt und mit einer transparenten Plastikfolie bedeckt. Ein Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak) wurde aufgelegt und für 5 sek bis zu 3 h belichtet. Der Film wurde in einer automatischen Entwicklungsmaschine (Agfa Curix 50) entwickelt.

10 x TBS

| | |
|---------|-------|
| Tris-Cl | 0,2 M |
| NaCl | 1,37M |
| pH 7,6 | |

Blocklösung

10 % FCS in TBS-T

TBS-T

0,1 % TWEEN-20 (v/v) in TBS

| Zielprotein | primärer Antikörper | sekundäre Antikörper |
|-------------|---------------------------------------|---|
| GFP | anti-GFP 101G4 IgG Kulturüberstand | anti-Maus IgG und IgM-Peroxidase 1:2000 Verdünnung |

Tabelle 2: Antikörper in der Immunodetektion

2.4.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie werden Proteine in fixierten und permeabilisierten Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert, und diese primären Antikörper mit Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpern lokalisiert (Tabelle 3).

Die auf Deckgläsern kultivierten Zellen wurden für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung in CB 6,1 fixiert und anschließend mit 0,1 % Triton-X100 in CB 6,1 für 2 min permeabilisiert. Nach dreimaligen Waschen in TBS und Blocken für 15 min mit 1 % BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma) in TBS wurden die Zellen für 30 min mit Phalloidin bzw. dem primären Antikörper inkubiert. Die Deckgläser wurden nun dreimal hintereinander kurz in Gefäße mit TBS getaucht und restliche Flüssigkeit jedes Mal durch kurzes Aufkanten der Deckglaskante auf saugfähigem Papier entfernt. Danach erfolgte eine ebenfalls 30 minütige Inkubation mit dem gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper. Nach dem Waschen wie zuvor wurden die Zellen in ProLong Antifade (Molecular Probes) eingebettet und 1 h bei 37°C gehärtet.

| Zielprotein | primärer Antikörper | sekundärer Antikörper |
|-------------------------------|--|---|
| VASP | anti-VASP IgG 273D4 (Abel <i>et al.</i> , 1995), Kulturüberstand | Ziege-anti-Maus IgG (Dianova), 1:200 |
| Vinculin | anti-hVIN-1 (Sigma), 1:200 | Ziege-anti-Maus IgG (Dianova), 1:200 |
| Mena | anti-Mena IgG 49C2B12, 1:200 | Ziege-anti-Maus IgG (Dianova), 1:200. |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Anti-Listerien-Serum K52 , 1:100 | Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova), 1:200 |
| F-Aktin | Texas-Red konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes) | |

Tabelle 3: Antikörper in der Immunfluoreszenz

F-Aktin wird durch Phalloidin, das direkt an ein Fluorophor gekoppelt ist, markiert.

10 x TBS (Tris-buffered-saline)

| | |
|-----------|--------|
| Tris Base | 0,2 M |
| NaCl | 1,37 M |
| pH | 7,6 |

CB 6,1 (“cytoskeleton buffer“ pH 6,1)

| | |
|-------------------|--------|
| MES | 10 mM |
| NaCl | 150 mM |
| EGTA | 5 mM |
| MgCl ₂ | 5 mM |
| Glucose | 5 mM |
| pH | 6,1 |

4 % PFA in CB

CB 6,1 wurde auf 80 °C erhitzt, 4 % Paraformaldehyd hinzugegeben und bei konstant 80 °C durch Rühren gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert wieder auf pH 6,1 eingestellt und die fertige Lösung in Aliquots bei -20 °C eingefroren.

2.5 Gewebekultur

2.5.1 Medien und Zusätze

DMEM

Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium mit 1000 mg/ml Glukose und 110 mg/ml Na-Pyruvat (Gibco BRL)

MEM

Minimal essentielles Medium mit 1,5 g/l Natriumbikarbonat und 1 mM Natriumbikarbonat (Gibco BRL)

L15

Leibovitz`s L-15 Medium mit 300 mg/ml L-Glutamin (Gibco BRL)

FCS

Fötale Kälber Serum (Gibco BRL) wurde bei 56 °C für eine Stunde hitzeinaktiviert und filtriert.

100 x P/S-Lösung

Penicillin (5000 U/ml), Streptomycin (5000 mg/ml)-Lösung (Gibco BRL) kann den Medien zur Kontaminationsvorbeugung zugesetzt werden.

100 x Glutaminlösung

200 mM L-Glutamin

100 x Nicht essentielle Aminosäuren

10 mM nicht essentielle Aminosäuren (Gibco BRL)

Interferon- γ

Rekombinantes Maus Interferon- γ aus CHO Zellen (Gibco BRL)

2.5.2 Kulturmaterial

Die Kultur erfolgt auf Plastikgewebekulturschalen (Nunc) mit den Durchmessern 10, 6 oder 3 cm.

MV^{D7} Zellen wurden für die Mikroskopie auf Fibronectin beschichteten, alle anderen Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Zur Reinigung wurden die Deckgläschen 20 min in einer Lösung aus 40 % Ethanol und 60 % HCl gereinigt, ausgiebig in deionisiertem Wasser gewaschen, getrocknet und 30 min unter UV-Licht sterilisiert. Die Poly-L-Lysin Beschichtung erfolgt für 1 h mit 20 mg/ml Poly-L-Lysin Lösung. Die Deckgläschen wurden dann in deionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Fibronectin aus Humanplasma (Boehringer Mannheim) wurde in sterilem Wasser rekonstituiert und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Direkt vor der Verwendung wurde ein Aliquot in PBS verdünnt (Endkonzentration 100 μ g/ml), auf dem gereinigtem Deckglas verteilt und 1h bei 37 °C inkubiert. Die so vorbereiteten Deckgläschen konnten feucht bei 4 °C gelagert werden.

2.5.3 Zellen und Kulturbedingungen

PtK2

Nierenepithelzellen aus *Potorou tridactylis* (ATCC, CCL 56)

| | |
|---------|--|
| Medium | DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, |
| Kultur | 37 °C, 7,5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen oder auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen |
| Passage | 5 min Trypsinisieren bei 37 °C |

HeLa

Humanadenokarzinomepithelzellen (ATCC, CCL 2)

| | |
|---------|--|
| Medium | MEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren |
| Kultur | 37 °C, 7,5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen oder auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen |
| Passage | 3 min Trypsinisieren bei 37 °C |

WI-38

Humane Fibroblasten (ATCC, CCL 75)

| | |
|---------|--|
| Medium | MEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren |
| Kultur | 37 °C, 7,5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen |
| Passage | 3 min Trypsinisieren bei 37 °C |

Ntera-2

Humanes Testicular-Embryonalkarzinom (ATCC, CRL-1973)

| | |
|---------|---|
| Medium | DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin |
| Kultur | 37 °C, 7,5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen |
| Passage | 3 min Trypsinisieren bei 37 °C |

REF-52

Rattenembryofibroblasten

| | |
|---------|--|
| Medium | DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin |
| Kultur | 37 °C, 7,5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen oder auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen |
| Passage | 3 min Trypsinisieren bei 37 °C |

B16-F1

Mausmelanomzellen (ATCC, CRL-6323)

| | |
|---------|--|
| Medium | DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin |
| Kultur | 37 °C, 7,5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen oder auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen |
| Passage | 3 min Trypsinisieren bei 37 °C |

MV^{D7}

Mausembryofibroblasten aus Mena^{-/-}, VASP^{-/-} “knockout“-Mäusen (Bear *et al.*, 2000)

| | |
|---------|---|
| Medium | DMEM, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Interferon- γ (Immorto-Medium) |
| Kultur | 32 °C, 5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen oder auf Fibronectin beschichteten Deckgläschen |
| Passage | 3-5 min Trypsinisieren bei 37 °C |

Bosc-23

Verpackungszellen für den retroviralen Gentransfer

| | |
|------------|---|
| Medium | DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin |
| Inkubation | 37 °C, 7,5 % CO ₂ in Nunc Petrischalen |
| Passage | 2 min Trypsinisieren bei Raumtemperatur |

2.5.4 Trypsinisieren und Passage

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sie sich ablösen oder abspülen ließen. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigen Medium gestoppt und die Zellen in einem neuen Kulturgefäß replattiert.

PBS

| | |
|----------------------------------|---------|
| KH ₂ PO | 41,5 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 8,3 mM |
| NaCl | 140 mM |
| KCl | 2,6 mM |
| pH 7,3 | |

Trypsin/EDTA-Lösung

0,5 g/l Trypsin-EDTA, 0,2 g/l EDTA (Gibco BRL)

2.5.5 Lagerung in Stickstoff

Die Zellen wurden bis zu 90 % Konfluenz kultiviert, abtrypsinisiert und mittels Zentrifugation mit 1000 x g für 3 min pelletiert. Das Zellpellet von einer 10 cm Schale wurde in 4 ml Medium mit 10 % DMSO (v/v) resuspendiert und in Kryoröhrchen zu 1 ml Aliquots verteilt. Diese wurden in einer isolierenden Styroporkiste innerhalb eines Tages langsam auf -80 °C gekühlt und dann in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen im 37 °C Wasserbad schnell erwärmt, in 5 ml Medium verdünnt, zentrifugiert (s.o.), das Pellet in 4 ml Medium resuspendiert und in 6 cm Schalen plattiert.

2.6 Gentransfer in Eukaryontenzellen

2.6.1 Transfektion mit FuGENE 6

PtK2, HeLa, B16-F1 und REF-52 Zellen wurden mit FuGENE 6 (Boehringer Mannheim) transient transfiziert. Zu 94 ml serumfreiem Medium wurden 6 µl FuGENE 6 sowie 2 µg DNA-Lösung (0,5 mg/ml) gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde direkt auf die Zellen in 6 cm Kulturschalen mit 4 ml Medium pipettiert.

2.6.2 Retroviraler Gentransfer

Ecotrophe, replikationsinkompetente Retroviren wurden verwendet um fremd-DNA stabil im Genom der MV^{D7} Zellen zu integrieren (Abbildung 8).

Hierzu wurde der ORF des zu exprimierenden GFP-Fusionsproteins in den pMSCV Vektor kloniert. Dieser Vektor erlaubt die Transkription einer RNA, in der die kodierende Sequenz von viralen Verpackungssignalen flankiert ist. Der Vektor wurde zusammen mit dem Helferplasmid pCL-Eco (Imgenex), das Gene für die retroviralen Komponenten trägt, mittels Kalziumphosphat-Transfektion in die Verpackungszellen Bosc-23 transfiziert. Diese verpacken die produzierte RNA in virale Partikel und geben sie in das Zellmedium ab. Das virenhaltige Medium wurde geerntet und zusammen mit Polybrene, welches die Infektion der Zielzellen durch Neutralisation von geladenen Zelloberflächenproteinen erleichtert, auf sich teilende MV^{D7} Zellen gegeben. Die virale RNA wird revers transkribiert und während der Mitose in das MV^{D7} Genom integriert.

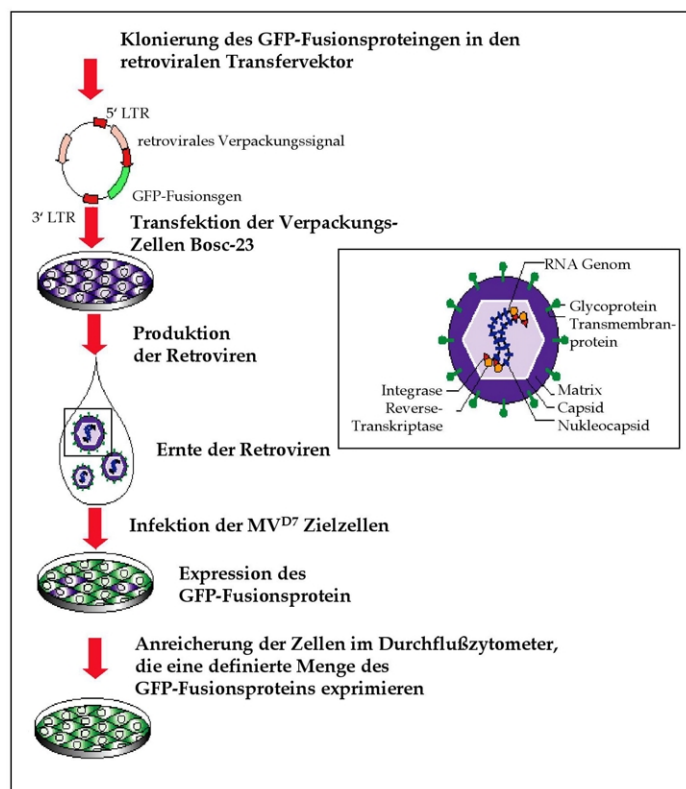


Abbildung 8: Retroviraler Gentransfer

In dieser Skizze ist der Weg zur Herstellung von MV^{D7} Zellen, die ein GFP-Fusionsprotein in einer gewünschten Menge exprimieren, dargestellt (nach Clontech). Das entsprechende Gen wird in den retroviralen Transfervektor kloniert und dieser in die Verpackungszellen Bosc-23 transfiziert. Die Zellen können nun den replikationsinkompetenten Retrovirus produzieren. Sie benötigen dazu noch weitere Retrovirusgene (s. Kasten), die durch die Transfektion mit einem Helferplasmid zusammen mit dem Transfervektor in die Zellen gebracht wurden. Die produzierten Retroviren im Zellüberstand werden geerntet und zu den MV^{D7} Zellen gegeben. Sie bauen das GFP-Fusionsproteing in das MV^{D7}-Genom ein, so dass das Transgen stabil exprimiert wird (grüne Zellen). Aus dieser heterogen exprimierenden Population wird durch Durchflußzytometrie eine definiert exprimierende Population aussortiert (s. 2.7).

Die Bosc-23 Zellen wurden in 6 cm Kulturschalen plattiert und bis ca. 70 %

Konfluenz kultiviert. Der Transfektionsansatz wurde in einem 15 ml Plastikröhrchen in folgender Reihenfolge angesetzt:

Transfektionsansatz

| | |
|--|------------|
| Wasser | ad. 0,5 ml |
| Plasmid-DNA | 6,2 µg |
| pCL-Eco | 3,3 µg |
| 2M CaCl ₂ | 62,5 µl |
| 2 x HBS | 0,5 ml |
| 10 s mit 5 ml Pipette Luftblasen erzeugen und auf das Kulturmedium tropfen | |

6-8 h nach der Transfektion wurde das Medium ausgetauscht. Einen Tag nach der Transfektion wurde erneut das Medium gewechselt (3 ml Volumen) und die Zellen ab jetzt bei 32 °C inkubiert, da die produzierten Viren bei 32 °C besser erhalten werden. Die transfizierten GFP-Fusionsproteine wurden in den Bosc-23 Zellen exprimiert, so dass der Erfolg der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden konnte. Nach einem weiteren Tag wurde das virushaltige Medium geerntet und Zelltrümmer abzentrifugiert. Die 3 ml virenhaltiger Zellüberstand wurden mit 1 ml Immorto-Medium und 8µl Polybrene (Stammlösung 4 mg/ml in PBS) gemischt und auf die MV^{D7} Zellen (50 % Konfluenz) in 6 cm Petrischalen gegeben. Nach einem weiteren Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden expandiert und in der Durchflußzytometrie verwendet.

2 x HBS

| | |
|--|---------|
| NaCl | 16,4 g |
| HEPES | 11,9 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,21 g |
| H ₂ O | ad. 1 l |
| pH 7,05 - 7,12 mit 5 N NaOH einstellen | |

2.7 Durchflußzytometrie

MV^{D7} Zellen wurden anhand der Fluoreszenzintensität des transferierten GFP-Fusionsproteins mittels Durchflußzytometrie in definierte Populationen sortiert.

Die zu sortierenden Zellen auf einer 10 cm Schale wurden bei etwa 80 % Konfluenz Trypsinisiert, Pelletiert und in 1 ml eiskalten FACS-Puffer (2 % FCS in PBS)

resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden bis zur Durchflußzytometrie auf Eis gehalten. Direkt vor der Durchflußzytometrie wurde Propidiumiodid bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Das Propidiumiodid markiert tote Zellen, indem es die instabile Membran durchdringt und in die DNA interkaliert. Es wurden 50.000 den Parametern entsprechende lebende Zellen im FACS-Gerät ("fluorescence activated cell sorter", Becton Dickinson Vantage mit Cell-Quest Software) aussortiert, mit Standard-Medium gewaschen und in einer 6 cm Schale plattiert. Um einer Kontamination vorzubeugen, wurde dem Medium in den folgenden drei Kulturtagen 50 µg/ml Gentamycin zugesetzt. Die Zellen wurden expandiert und in Aliquots eingefroren.

Um eine potentielle Veränderung der Expressionsrate der fraglichen Proteine während der Kulturzeit zu untersuchen, wurden die Populationen nachträglich im Durchflußzytometer (FACScalibur, Becton Dickinson mit Cell-Quest Software) kontrolliert und mit der Referenzpopulation verglichen.

2.8 Infektion eukaryonter Zellen mit *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes wurde auf BHI-Agar ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C kultiviert und bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Am Vorabend der Infektion wurden 5 ml BHI-Medium von der Platte angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 200 UpM inkubiert. Zur Infektion wurden 0,5 ml Listerienkultur durch Zentrifugation mit 3000 x g, 3 min pelletiert und der Überstand abgenommen. Um Kulturüberstandreste zu entfernen, wurden die Listerien in 0,5 ml Infektionsmedium (DMEM mit Glutamin) resuspendiert, erneut pelletiert und wiederum in 0,5 ml Infektionsmedium aufgenommen.

Die Listerien wurden nun in Infektionsmedium verdünnt: 1:1000 für PtK2 und HeLa Zellen, 1:333 für MV^{D7} Zellen. Von dieser Verdünnung wurden 4 ml pro 6 cm Kulturschale eingesetzt.

Die zu infizierenden Zellen, seit einem Tag in antibiotikafreiem Medium kultiviert, wurden einmal mit Infektionsmedium gewaschen und dann das Medium durch die

verdünnte Listeriensuspension ersetzt. Um die Infektion zu synchronisieren, wurden die Listerien mit 1000 x g für 3 min auf die Zellen zentrifugiert. PtK2 und HeLa Zellen wurden eine Stunde und die MV^{D7} Zellen 1,5 h bei 37 °C mit den Listerien inkubiert. Danach wurde das Infektionsmedium durch Standardmedium mit 50 µg/ml Gentamycin (ohne Penizillin/Streptomycin) ersetzt. Das Gentamycin tötet die noch extrazellulären Listerien ab, beeinträchtigt aber nicht die intrazellulären Bakterien. Die MV^{D7} Zellen wurden ab jetzt wieder bei 32 °C inkubiert.

2.9 Mikroskopie

Für die Videomikroskopie und Immunfluoreszenzmikroskopie wurde das Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV (Carl Zeiss) mit den Objektiven 63 x Plan-Apo 1,40 NA und 100 x Plan-Apo 1,40 NA sowie 1,6- oder 2,5-fachen Optovar verwendet. Das verwendete Immersionsöl (Carl Zeiss) hat einen Brechungsindex von 1,518. Die Anregung der Fluorophore erfolgte mit regelbarer 100 W Quecksilber-Hochdruckdampflampe (Atto Arc, Carl Zeiss) oder 100 W Halogenlampe, als Lichtquelle für Phasenkontrastaufnahmen diente eine 100 W Halogenlampe. Die Belichtungszeit wurde mit elektromechanischen Verschlüssen (Uni Blitz Modul D 122 Shutter Driver, Visitron Systems) gesteuert.

Die folgenden Filterkombinationen (Chroma Technology Corp.) wurden in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet (Tabelle 4):

| Fluorophor | Immissionsfilter | Dichroik | Emmissionsfilter |
|--------------------|---|--|---|
| Texas Red | Texas Red Exciter HQ560/55x 41004 | Texas red Dichroic Q595LP 41004 | Texas red Emitter HQ645/75m 41004 |
| EGFP, Alexa 488 | FITC/EGFP Exciter HQ480/40 41001 | FITC/EGFP Dichroic Q505LP 41001 | FITC/EGFP Emitter HQ535/50 41001 |
| ECFP | ECFP-Exiter D436/20 31044v2 | ECFP/EYFP Dichroic 51017bs | ECFP/EYFP Emitter 51017 m |
| EYFP | EYFP Exiter HQ500/20xBP 41028 | ECFP/EYFP Dichroic 51017bs | ECFP/EYFP Emitter 51017 m |
| AMCA | Narrow Blue/Violet Exciter D435/10x | Narrow Blue/Violet Dichroic 460DCLP | Narrow Blue/Violet Emitter GG475L |

Tabelle 4: Filterkombinationen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Tabelle zeigt die verwendeten Filter-Dichroik Kombination für jedes Fluorophor.

Die Bildaufnahme wurde mit einer auf -30 °C gekühlten “charged-coupled-device“ (CCD) Kamera (TE/CCD-1000 TKB CCD Detector grade 1 backilluminated, Princeton Instruments Inc.) durchgeführt. IPLab Spectrum Scientific Imaging Software (Scanalytics Inc.) wurde zur Bildverarbeitung und Koordination der Aufnahme verwendet. Weitergehende Bildbearbeitung erfolgte mit MicroTome (Vay Tek, Inc.) und Photoshop (Adobe).

Zur Mikroskopie lebender Zellen wurden sie auf 40 mm Deckgläsern kultiviert und diese in eine beheizbare geschlossene Mikroskopiekammer (The Focht Live Cell Chamber System FCS2, Bioptechs) eingebaut. Um Wärmeverlust durch die Immersionsölobjektive zu verhindern, wurden diese zusätzlich beheizt (Bioptechs). Zur Kontrolle des pH-Wert wurde während der Mikroskopie Medium auf HEPES gepufferter L15 Basis verwendet.

2.10 Videomikroskopieanalyse und Statistische

Methoden

2.10.1 Vergleich der Profilin II-GFP Fluoreszenzintensität mit der listeriellen Geschwindigkeit

Um die Fluoreszenzintensität von Profilin II-GFP in Videomikroskopieaufnahmen zu

messen, wurde ein kreisförmiger Messbereich mit einem konstantem Durchmesser von 0,4 μm auf dem posterioren Bakterienpol zentriert. Die maximale Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Messbereichs wurde als Indikator für die relative Profilin II-GFP Menge an diesem Pol verwendet. Innerhalb einer Sequenz wurde die größte maximale Intensität zu 100 % gesetzt und für alle anderen Werte als Referenz verwendet. Die Momentangeschwindigkeit wurde mit der Zentralen-Differenz-Methode errechnet und deren Korrelation zur Profilin II-GFP Fluoreszenzintensität mit Excel 5.0 (Microsoft Corp.) bestimmt.

2.10.2 Analyse der Listeriengeschwindigkeit in MV^{D7} Zellen

Die Geschwindigkeit motiler Listerien in infizierten MV^{D7} Zellen wurde anhand von Videomikroskopieaufnahmen ermittelt. Diese wurden mit 100-facher Objektivvergrößerung aufgenommen, um eine ausreichende räumliche Auflösung zur genauen Messung der zurückgelegten Wegstrecke zu erhalten. Die Einzelbilder wurden mit 20-60 sek Abstand aufgenommen, um die Listerien, je nach zu erwartender Geschwindigkeit, verfolgen zu können. Alle Listerien in einer Sequenz die eindeutig motil und nicht durch die Plasmamembran oder die Kernhülle in ihrer Bewegung behindert waren, wurden für die Geschwindigkeitsmessung verwendet.

Die Verfolgung der Listerien, Rekonstruktion der Wege und die Kalkulation der durchschnittlichen Geschwindigkeit erfolgte mittels DIAS Software (Dynamic Imaging Analysis System, Solltech Inc.). Dazu wurden in den Einzelbildern einer Sequenz die Position des posterioren Bakterienzellpols markiert, die Strecke zwischen diesen Markierungen in zwei aufeinanderfolgenden Einzelbildern gemessen und die momentanen Geschwindigkeiten mit der Zentralen-Differenz-Methode berechnet. Die einzelnen Momentangeschwindigkeiten eines verfolgten Bakteriums wurden zur Durchschnittsgeschwindigkeit eines Bakteriums zusammengefasst. Für jede Zellpopulation wurden aus mindestens zehn Sequenzen (in mindestens drei getrennten Experimenten aufgenommen) 50-150 Durchschnittsgeschwindigkeiten bestimmt.

Zum Vergleich der Datengruppen wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test gewählt, da die gemessene Variabel kontinuierlich, nicht unbedingt normalverteilt (Anderson-Darling-Test auf Normalverteilung) und die Varianz

inhomogen ist. Die getestete Hypothese H_1 lautet: “Die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der motilen Listerien in den verglichenen MV^{D7} Populationen unterscheidet sich!”. Die assoziierte Null-Hypothese H_0 lautet dementsprechend: “Die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der motilen Listerien in den verglichenen MV^{D7} Populationen sind gleich!”. Ist die Wahrscheinlichkeit p für $H_0 < 0,05$ wurde sie verworfen, so dass die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der motilen Listerien in den verglichenen MV^{D7} Populationen mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit signifikant verschieden waren (Dytham, 1999). Die Tests wurden mit MiniTab (MiniTab Inc.) durchgeführt.

Für die Darstellung der Messwerte wurde das “box and whiskers“ Diagramm verwendet, das sowohl die Lokalisation als auch die Verteilung der Messwerte zeigt. Die “box“ beinhaltet die “interquartile-range“ mit 50 % der Messwerte ober- und unterhalb des Median (mittlerer Strich). Die “whiskers“ zeigen die Ausdehnung der extremen Werte, die 80 % der Messwerte ober- und unterhalb des Median umfassen. Der Punkt zeigt das Arithmetische Mittel (Dytham, 1999). Die “box and whiskers“-Diagramme wurden mit DeltaGraph (Delta Point Inc.) erzeugt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung von GFP-markierten Profilin I und Profilin II

Die Klonierung von GFP-markierten Profilin erschien hinsichtlich der Funktionalität des Fusionsproteins problematisch. Profilin ist wesentlich kleiner als GFP (12-15 kDa gegenüber 27-30 kDa), und sowohl das Amino- als auch das Carboxyende sind nicht frei, sondern Teil der Bindungsdomänen des Proteins (Raghunathan *et al.*, 1992, Bjorkegren *et al.*, 1993, Mahoney *et al.*, 1997, Chaudhary *et al.*, 1998). Das Anhängen der GFP-Domäne könnte somit die Interaktion von Profilin mit seinen Bindungspartnern sterisch oder durch die Veränderung der Bindungsdomänen verhindern. Aus diesem Grund sollte das GFP durch lange, flexible und hydrophile Linker vom Profilin separiert und sowohl die Verbindung mit dem Amino- als auch mit dem Carboxyterminus getestet werden.

Die cDNA für Profilin I und Profilin II (das später als Profilin IIb bezeichnet wurde, s. 1.3.6) wurde ausgehend von gesamt-RNA Präparationen aus humanen Fibroblasten bzw. Ntera-2 Zellen durch “reverse“-Transkriptase PCR kloniert. Hierzu wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet (Tabelle 5):

| | |
|-----------------------|-----------------------------|
| Profilin I vorwärts | CCCAGTAGCAGCGCCATGGCC |
| Profilin I rückwärts | GGAAGGGACAGACGAGGTCAGTACT |
| Profilin II vorwärts | GGGCTCGAAGATGGCCGGTTGGC |
| Profilin II rückwärts | GAGAGGCTGCTTACACATCAGACCTCC |

Tabelle 5: Oligonukleotide für die “reverse“-Transkriptase PCR von Profilin

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer für den kodierenden (vorwärts) und den komplementären Strang (rückwärts).

Alle so gewonnenen cDNAs wurden erneut amplifiziert (Tabelle 6) und in pCR2.1-TOPO kloniert, um Restriktionsschnittstellen hinzuzufügen und für die spätere Klonierung in pEGFP-N1 das Stop-“codon“ zu eliminieren. Abschnitte des pCR2.1-TOPO Vektors bilden im späteren Fusionsprotein Teile des Linkers.

| | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Profilin I vorwärts | CCTTCCCGAATTCAGCGCCATGG |
| Profilin I rückwärts (für pEGFP-N1) | GGAAGGGGAATTCGAGGTCCGTAC |
| Profilin I rückwärts (für pEGFP-C2) | GGAAGGGGAATTCGAGGTCACTAC |
| Profilin II vorwärts | ACCATGGCCGGTTGG |
| Profilin II rückwärts (für pEGFP-N1) | CTAACACATCAGACCTCCTCAGG |
| Profilin II rückwärts (für pEGFP-C2) | CTTACACATCAGACCTCCTCAGG |

Tabelle 6: Oligonukleotide für die Klonierung von Profilin-GFP bzw. GFP-Profilin

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer für den kodierenden (vorwärts) und den komplementären Strang (rückwärts). In pEGFP-N1 entsteht Profilin-GFP (GFP am Carboxyterminus vom Profilin) und im pEGFP-C2 GFP-Profilin (GFP am Aminoterminal vom Profilin).

Die Gene wurden mit EcoRI herausgeschnitten und in dieselbe Stelle in pEGFP-N1 oder pEGFP-C2 “in frame“ mit dem EGFP kloniert. So entstanden zwischen Profilin und EGFP folgende aus überwiegend hydrophilen Aminosäuren bestehende “linker“ (Tabelle 7).

| | | |
|--------------|----------------------|--------------|
| Profilin I- | GPRILQSTVPRARDPPVAT | -GFP |
| Profilin II- | LEGRILQSTVPRARDPPVAT | -GFP |
| GFP- | SGRTQISSSSFEFSA | -Profilin I |
| GFP- | SGRTQISSSSFEFALT | -Profilin II |

Tabelle 7: Linker zwischen Profilin und EGFP

3.2 Profilin II-GFP lokalisiert spezifisch an Listerien

Intrazelluläre Listerien rekrutieren Ena/VASP-Proteine, die wiederum Profilin Liganden sind (s. 1.3.6, 1.3.7 und 1.5). Die klonierten Profilin I und Profilin II Fusionsproteine mit GFP sollten also an Listerien lokalisieren. Deshalb wurden sie transient in PtK2 Zellen transfiziert und diese mit *Listeria monocytogenes* infiziert. Die infizierten Zellen wurden fixiert und F-Aktin Strukturen mit Texas Red-Phalloidin gefärbt. Während beide Profilin I Fusionsproteine und das GFP-Profilin II nur diffus im Zytoplasma verteilt zu erkennen waren, konnte das Profilin II-GFP auch an der Zellwand von motilen Listerien mit einem Maximum am posterioren, also dem Listerienschweif zugewandten, Pol nachgewiesen werden (Abbildung 9). Diese gradientartige Verteilung an der Listerienwand ähnelte der bekannten VASP Lokalisation. Stationäre Listerien zeigten keine Profilinlokalisierung an der Zellwand, obwohl VASP an diesen gleichmäßig verteilt an der Zellwand lokalisiert. Da nur das Profilin II-GFP eine derartige spezifische Lokalisation erkennen lies, wurde es für die folgenden Untersuchungen verwendet.

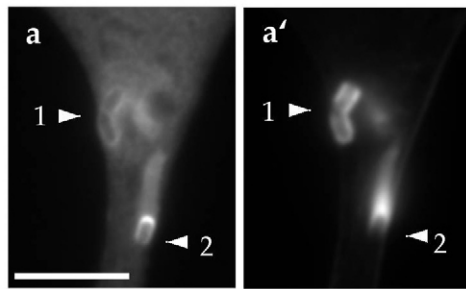


Abbildung 9: Lokalisation von Profilin II-GFP in Listerien infizierten PtK2 Zellen

Profilin II-GFP exprimierende PtK2 Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* infiziert und fixiert (**a**). F-Aktin wurde mit Texas-Red-Phalloidin gefärbt (**a'**). Profilin II-GFP wird an dem Schweif zu-gewandten Bakterienpol motiler Listerien angereichert (Pfeil 2), jedoch nicht an stationären Bakterien die keinen Schweif ausbilden (Pfeil 1). Der Balken entspricht einer Länge von 5 µm.

3.3 Die GFP-Markierung verändert nicht die Ligandenbindung des Profilin II-GFP

Um sicherzustellen, dass das Profilin II-GFP keine veränderte Ligandenbindung im Vergleich zum unmarkierten Profilin II aufwies, wurden die Wechselwirkungen beider Proteine mit G-Aktin, PIP₂ und VASP vergleichend untersucht.

Zur Expression in *E. coli* wurde Profilin II zuerst in pGEX-2T (Pharmacia), danach aber wegen ungenügender Expression in pET-28 (Novagen) kloniert. Auch für alle anderen zu exprimierenden Proteine wurde dann der pET-28 Vektor verwendet.

Die Profilin II cDNA wurde PCR-amplifiziert (Tabelle 8) und nach Verdau mit BamHI in dieselbe Stelle von pGEX-2T kloniert. Profilin II wurde dann wieder mit NcoI und EcoRI herausgeschnitten und in dieselben Stellen von pET-28 ligiert.

Profilin II-GFP wurde durch unvollständigen Verdau mit NcoI und EcoRI aus pEGFP-N1 herausgeschnitten und in dieselben Stellen von pET-28 ligiert.

| | |
|-----------|----------------------------|
| vorwärts | CCCTTGGGCGGATCCATGGCCG |
| rückwärts | GGTAGATGGGGGGATCCTGCTTACAC |

Tabelle 8: Oligonukleotide für die Klonierung von Profilin II in pGEX-2T

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer für den kodierenden (vorwärts) und den komplementären Strang (rückwärts).

Die Expression der Profilinkonstrukte in *E. coli*, die Aufreinigung und die biochemische Analyse der Ligandenbindungseigenschaften wurde in der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. M. Jockusch* durchgeführt (Geese *et al.*, 2000), deshalb wird die Analyse hier nur zusammenfassend dargestellt.

Profilin II und Profilin II-GFP wurden in *E. coli* exprimiert und nach Zellaufschluss über eine Poly-L-Prolin-Säule von bakteriellen Proteinen getrennt. In beiden Fällen wurde die Säule mit 2 M Harnstoff gewaschen und das Protein mit 8 M Harnstoff eluiert. Dies zeigte bereits, dass beide Proteine vergleichbare Poly-L-Prolin-bindende Eigenschaften hatten.

VASP, an das Profilin über dessen Prolin-reiche Regionen bindet, wurde als repräsentativer Profilinligand zur genaueren Bestimmung der Prolin-bindenden Eigenschaften beider Proteine verwendet. Dazu wurden konstante Mengen aufgereinigtes Profilin II oder Profilin II-GFP auf ELISA-Platten immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen von VASP, das mit dem sog. "bipro-tag" markiert war ("bipro-tag"; Rüdiger *et al.*, 1997), inkubiert. Die Menge des gebundenen VASP wurde durch einen spezifischen Antikörper gegen den "bipro-tag" bestimmt. Die GFP-Domäne hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des gebundenen VASP (Abbildung 10a), was mit den Erkenntnissen über die Poly-L-Prolin-Bindung während der Aufreinigung übereinstimmt.

Die Interaktion beider Profilinvarianten an PIP₂ wurde Analog dem geschilderten ELISA-Verfahren mit einem spezifischen Antikörper gegen PIP₂ durchgeführt. Auch in der PIP₂-Bindung lässt sich kein Unterschied zwischen beiden Proteinen erkennen (Abbildung 10b).

Die Affinität der Profileine zu G-Aktin wurde unter polymerisierenden Bedingungen durch Messung der Veränderung der kritischen Konzentration von Aktin im Fließgleichgewicht ermittelt. Dazu wurden konstant 4 mM Profilin II oder Profilin II-GFP zu steigenden Konzentrationen von G-Aktin, davon 10 % mit Pyren markiert, gegeben. Nach Induktion der Polymerisation wurde der Anstieg der Aktinfilamentkonzentration durch Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen und gegen die Konzentration des eingesetzten G-Aktins aufgetragen. Sowohl das GFP

* Prof. Dr. B. M. Jockusch , Abteilung für Zoologie, Technische Universität Braunschweig

markierte wie auch das unmarkierte Profilin haben den gleichen hemmenden Einfluss auf die Aktinpolymerisation (Abbildung 10). Die GFP-Domäne veränderte die Wechselwirkung von Aktin zu Profilin also nicht nachweisbar.

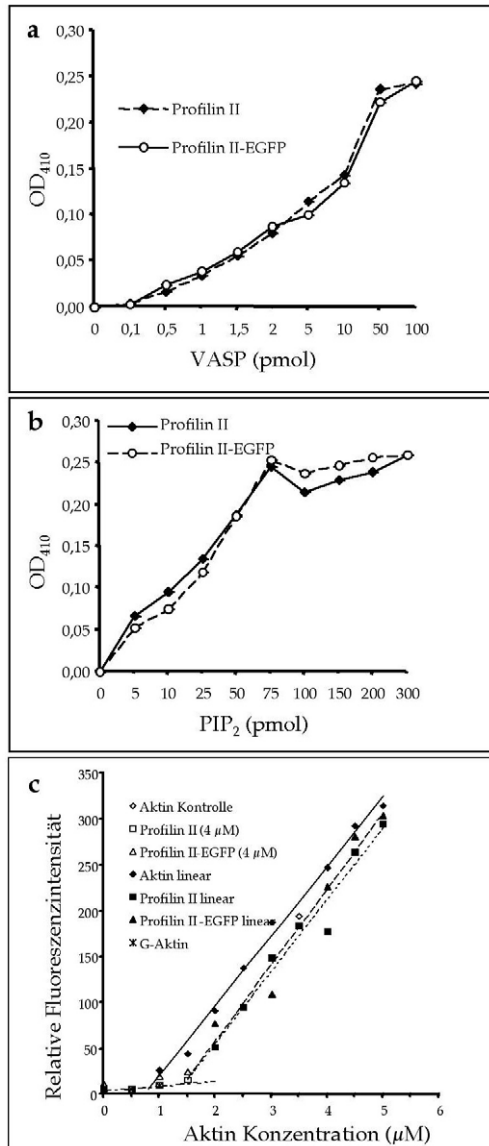


Abbildung 10: Die Ligandenbindungseigenschaften des Profilin II-GFP unterscheiden sich nicht vom unmarkierten Profilin

Die Bindung von unmarkierten Profilin II und Profilin II-GFP zu VASP (a), PIP_2 (b) und G-Aktin (c) wurden untersucht (s. Text). Die carboxyterminale GFP-Markierung zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Ligandenbindungseigenschaften des Profilin II (nach Geese *et al.*, 2000).

Die Lokalisation an Listerien und die unveränderten *in vitro* Ligandenbindungseigenschaften machten es sehr wahrscheinlich, dass die carboxyterminale GFP-Markierung die originalen Eigenschaften des Profilin II nicht wesentlich beeinflusst.

3.4 Profilin II-GFP lokalisiert in “focal adhesions”, Lamellipodien und Filopodien

Die Lokalisation und Dynamik von Profilin in lebenden Zellen sollte mithilfe des Profilin II-GFP eingehender untersucht werden. Da die Überexpression von Profilin zu Veränderungen der Mikrofilamentdynamik führen kann (Finkel *et al.*, 1994, Rothkegel *et al.*, 1996), wurden nur transfizierte Zellen ausgewählt, die ein gegenüber nicht transfizierten Zellen unverändertes Zytoskelet zeigten.

Die Profilin rekrutierenden Ena/VASP-Proteine assoziieren mit “focal adhesions”, der Lamellipodienfront und mit Filopodienspitzen (s. 1.3.7). REF-52 Zellen weisen erfahrungsgemäß besonders ausgeprägte “focal adhesions” auf und wurden deshalb verwendet um festzustellen, ob auch das Profilin II-GFP in diesen Komplexen lokalisiert. Tatsächlich lokalisierte es in “focal adhesion” ähnlichen fleckenförmigen Strukturen auf der Ebene der unteren Zellmembran. Die transfizierten Zellen wurden fixiert und das “focal adhesion” Protein Mena mit Antikörpern gefärbt. So konnte gezeigt werden, dass die Profilin II-GFP Lokalisation der von Mena in “focal adhesions” entspricht (Abbildung 11a, a'). Ebenfalls kolokalisiert das Profilin II-GFP mit dem “focal adhesion” Protein Vinculin (Abbildung 11b, b').

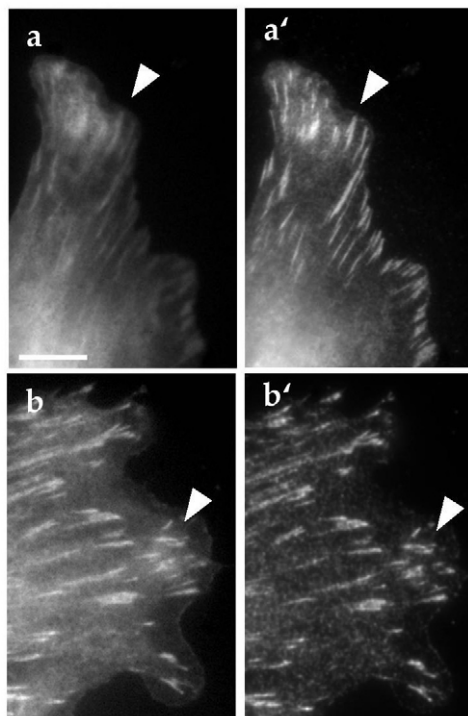


Abbildung 11: Lokalisation von Profilin II-GFP in “focal adhesions”

Profilin II-GFP exprimierende REF-52 Zellen wurden fixiert und Mena (a') oder Vinculin (b') mit Antikörpern gefärbt. Die Pfeile weisen auf “focal adhesions” hin, in denen sowohl Profilin und Mena (a und a') als auch Profilin und Vinculin (b und b') kolokalisieren. Der Balken entspricht 10 µm.

B16-F1 Zellen bilden große Lamellipodien aus, so dass sie ideal erschienen, um die

Profilin II-GFP Lokalisation in diesen hoch dynamischen Zellstrukturen zu untersuchen.

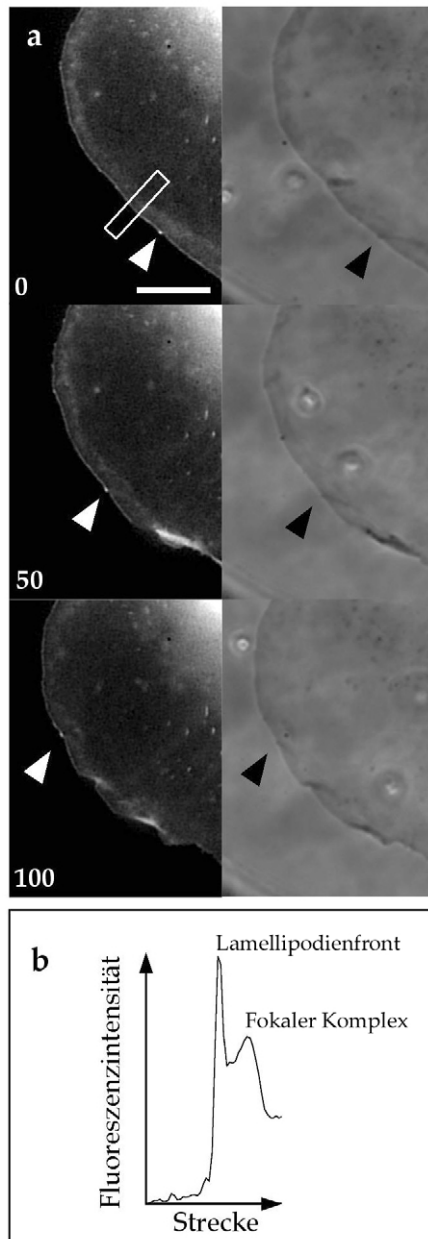


Abbildung 12: Profilindynamik in Lamellipodien

Videomikroskopiesequenz einer Profilin II-GFP exprimierenden B16-F1 Zelle. Auf der linken Seite sind Fluoreszenzaufnahmen und auf der rechten Seite die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zu sehen (a). Profilin lokalisiert in einer dünnen Linie direkt an der Front eines sich ausbreitenden Lamellipodiums und in fokalen Komplexen kurz hinter dieser Front. Der Pfeil weist auf die Spitze eines Filopodiums hin (optisch dichte Struktur in den Phasenkontrastaufnahmen), das sich lateral entlang der Front bewegt. Der Kasten begrenzt die Fläche des Intensitätsplots (b). Der erste Peak entsteht durch die Fluoreszenz direkt an der Lamellipodiumfront und der zweite breitere und tiefere Peak entsteht durch die fokalen Komplexe. Die Zeit in Sekunden ist in der unteren linken Ecke gezeigt. Der Balken entspricht 10 µm.

In transfizierten Zellen lokalisierte das Profilin II-GFP in einer dünnen Linie an der Front des sich ausbreitenden Lamellipodiums und in kleinen fleckenförmigen fokalen Komplexen (Abbildung 12a). Ein Scan der Fluoreszenzintensität senkrecht zur Lamellipodiumfront zeigt zwei Intensitätspeaks, die diesen Strukturen entsprechen (Abbildung 12a Rahmen und b). Diese Profilin II-GFP Lokalisation in Lamellipodien ähnelt stark der von VASP-GFP in dieser Zelllinie, das ebenfalls als dünne Linie direkt an der Front und kurz hinter der Front in fokalen Komplexen lokalisiert (Rottner *et al.*, 1999). Die Retraktion des Lamellipodiums ließ die Profilinlokalisierung

verschwinden.

Außerdem findet sich Profilin II-GFP an der Spitze von Strukturen, die sich lateral entlang der Lamellipodienfront bewegen (Abbildung 12a, Pfeil). In den entsprechenden Phasenkontrastbildern war zu erkennen, dass es sich hierbei um Filopodien handelt, wie sie anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen beschrieben wurden und ebenso durch VASP-GFP Lokalisation gekennzeichnet sind (Rottner *et al.*, 1999).

3.5 Nur motile Listerien rekrutieren Profilin II-GFP

In Abbildung 9 war eine Lokalisation des Profilin nur an einem Listerium mit ausgebildeten Aktinschweif zu erkennen, was somit wahrscheinlich zum Zeitpunkt der Fixierung motil war. Das stationäre Listerium hatte kein Profilin angereichert. Um detailliert zu analysieren, ob der Bewegungszustand der Listerien einen Einfluss auf die Profilinrekrutierung hat, wurden Videomikroskopieaufnahmen mit Profilin II-GFP exprimierenden PtK2 Zellen, die mit *Listeria monocytogenes* infiziert waren, durchgeführt. Sie belegen eindeutig, dass nur motile Listerien die gradientartige Profilinrekrutierung zeigen, während stationäre Listerien kein Profilin an ihrer Zellwand anreichern (Abbildung 13).

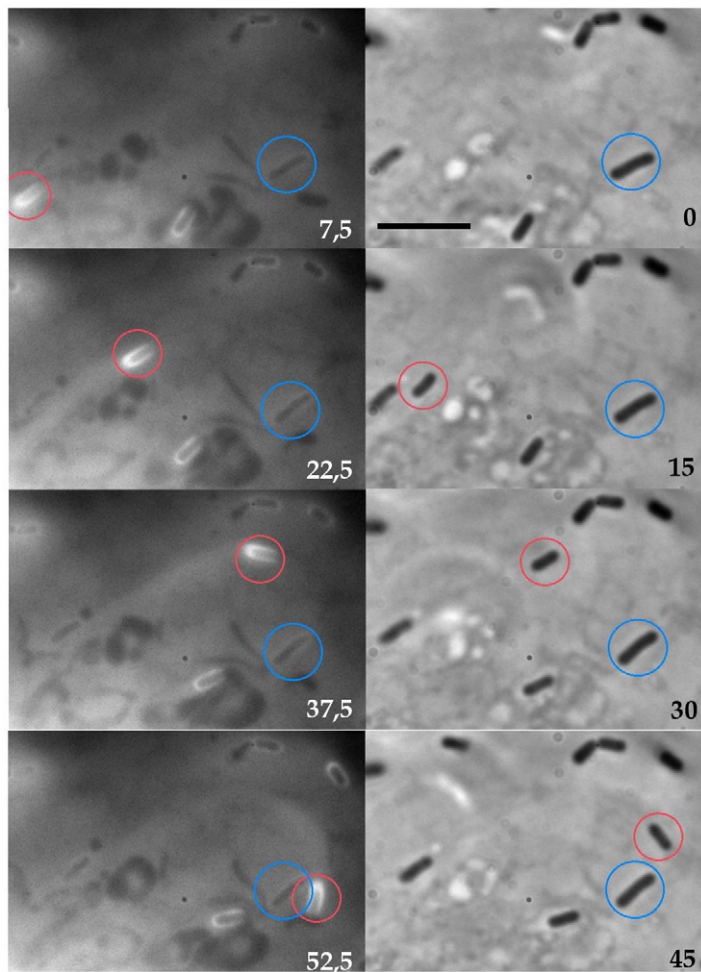


Abbildung 13: Profilin wird nur von motilen Listerien rekrutiert

Videomikroskopieaufnahmen einer Profilin II-GFP exprimierenden PtK2 Zelle, die mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert wurde. Auf der linken Seite sind Fluoreszenzaufnahmen und auf der rechten Seite die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zu sehen. Profilin lokalisiert an motilen Listerien (roter Kreis), aber nicht an Stationären (blauer Kreis). Die Zeit in Sekunden ist in der unteren rechten Ecke gezeigt (Aufgrund der langen Auslesezeit der CCD Kamera, haben die kurz hintereinander aufgenommenen Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder eine zeitliche Differenz). Der Balken entspricht 5 µm.

Diese Profilinrekrutierung verändert sich mit dem Bewegungszustand der Listerien. Abbildung 14 zeigt ein zu Beginn der Aufnahme stationäres Listerium ohne Profilinrekrutierung, zu erkennen am Schatten vor dem fluoreszierenden Hintergrund. Es beschleunigt dann, wobei gleichzeitig Profilin angereichert wird. Am Ende der Sequenz wird es wieder stationär und das Profilin delokalisiert zeitgleich. Die Profilinrekrutierung beginnt und endet also simultan mit dem Beginn und dem Ende der Listerienmotilität.

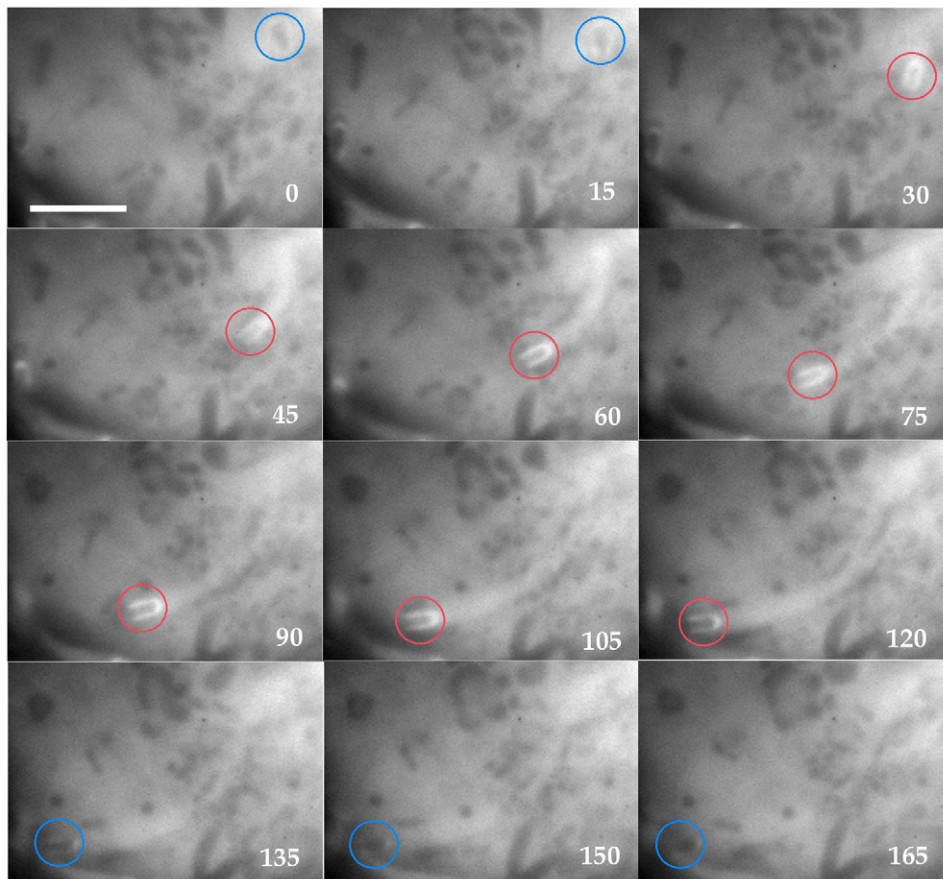


Abbildung 14: Die Profilinrekrutierung verhält sich dynamisch

Videomikroskopiesequenz einer Profilin II-GFP exprimierenden PtK2 Zelle die mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert wurde. Der Kreis kennzeichnet ein Listerium, das nur in der motilen Phase Profilin rekrutiert (roter Kreis), aber nicht in der Stationären (blauer Kreis). Die Zeit in Sekunden ist in der unteren rechten Ecke gezeigt. Der Balken entspricht 5 μ m.

3.6 Die Profilin-Rekrutierung korreliert mit der Listeriengeschwindigkeit

Da eine Assoziation von Profilin II-GFP ausschließlich an motilen Listerien erkennbar war und sich diese Assoziation zu Beginn und zum Ende einer motilen Phase auf- bzw. abbaut, sollte mithilfe videomikroskopischer Aufnahmen die Dynamik der Profilin II-GFP-Assoziation während dieser Geschwindigkeitsänderungen untersucht werden.

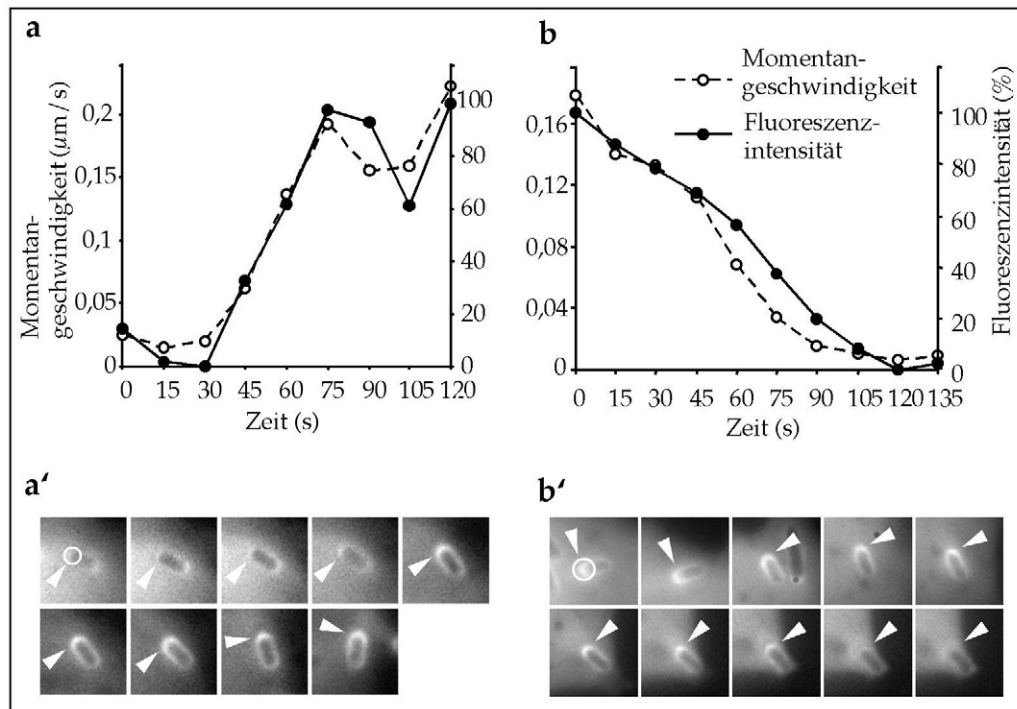


Abbildung 15: Korrelation der Listeriengeschwindigkeit und Profilinrekrutierung

Profilin II-GFP exprimierende PtK2 Zellen, die mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert waren, wurden mittels Videomikroskopie während der Beschleunigung (**a'**) und Verlangsamung (**b'**) aufgenommen. In jedem Einzelbild wurde die maximale Fluoreszenzintensität in einem kreisförmigen Ausschnitt (s. erstes Einzelbild) über dem posterioren Listerienpol gemessen und die Momentangeschwindigkeit ermittelt. Die maximale Fluoreszenzintensität und die entsprechende Momentangeschwindigkeit wurde über der Zeit aufgetragen (**a**, **b**). Sie korrelieren positiv.

Zur detaillierten Untersuchung dieses Verhaltens wurden mehr als zehn Sequenzen von Listerien, die ihre Geschwindigkeit während der Aufnahme änderten und dabei nicht von zellulären Strukturen behindert wurden, angefertigt und die Fluoreszenzintensität des Profilin II-GFP am posterioren Bakterienpol gemessen (s. 2.10.1). Bei der Beschleunigung steigerte sich die Fluoreszenzintensität des listeriell assoziierten Profilin II-GFP und sank wiederum bei einer Verlangsamung. Der Vergleich der gemessenen maximalen Fluoreszenzintensität mit der Momentangeschwindigkeit zeigte, dass die assoziierte Profilin II-GFP Menge mit der listeriellen Geschwindigkeit positiv korreliert (Abbildung 15). Dieses Ergebnis konnte in allen ausgewerteten Sequenzen, sowohl während der Beschleunigung als auch während der Verlangsamung, erzielt werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen Momentangeschwindigkeit und Profilin II-GFP Fluoreszenzintensität am posterioren Zellpol war immer größer als 0,95. Die durchschnittliche Listeriengeschwindigkeit war durch die Expression des Profilin II-GFP ($0,159 \pm 0,048 \mu\text{m/sek}$, $n = 23$) nicht

signifikant verschieden (“unpaired student’s t-test“, $p > 0,001$) von der in parentalen PtK2 Zellen ($0,146 \pm 0,036 \mu\text{m}/\text{sek}$, $n = 23$).

Profilin wird also zur Polymerisationszone motiler Listerien in Korrelation mit deren Geschwindigkeit rekrutiert.

3.7 VASP und Profilin kolokalisieren nur an motilen Listerien

Obwohl die Profilin II-GFP Lokalisation in “focal adhesions“, Lamellipodien und Filopodien der von Ena/VASP-Proteinen exakt entspricht, kann dies offensichtlich nicht für die Lokalisation an stationären Listerien zutreffen, da Ena/VASP-Proteine auch von stationären Listerien rekrutiert werden.

Um dies zu bestätigen, wurden intrazelluläre Listerien in HeLa Zellen mittels Videomikroskopie beobachtet, so dass motile und stationäre Listerien identifiziert werden konnten, bevor sie während der laufenden Aufnahme fixiert wurden (Abbildung 16). Die fixierten Zellen wurden mit Antikörpern gegen VASP und mit Phalloidin gefärbt. Das Profilin II-GFP kolokalisiert mit VASP nur an den motilen Listerien in der beschriebenen gradientartigen Verteilung mit dem Maximum am posterioren Pol. Im Gegensatz dazu zeigten die stationären Listerien keine Profilin II-GFP Lokalisation, während das VASP kontinuierlich entlang der Zellwand zu erkennen war (Abbildung 16e). Profilin und VASP kolokalisieren also nur an motilen Listerien gradientartig an der Bakterienzellwand.

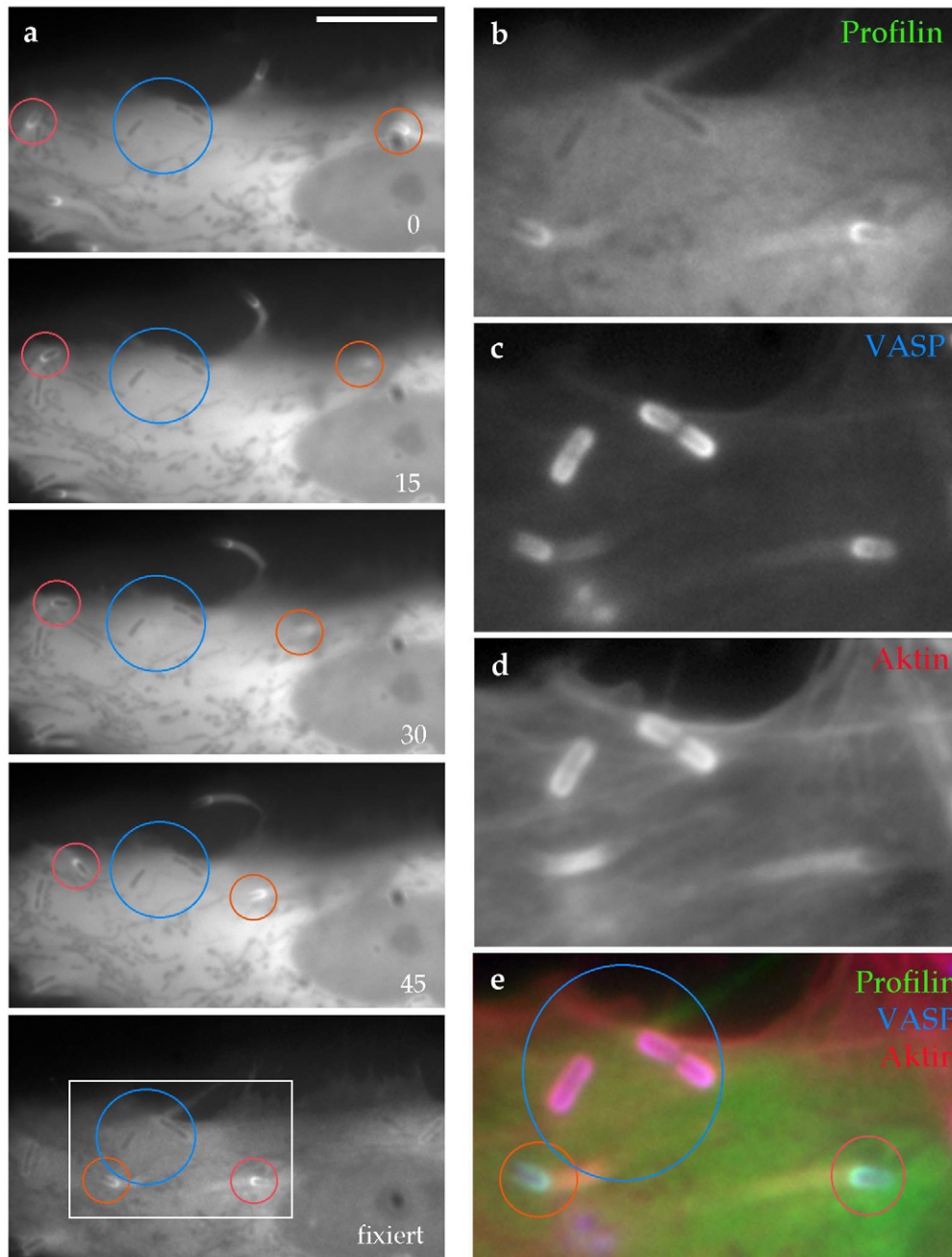


Abbildung 16: Profilin kolokalisiert mit VASP nur an motilen Listerien

Profilin II-GFP exprimierende HeLa Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert und mittels Videomikroskopie beobachtet. Die Sequenz (a) ermöglicht die Identifikation von motilen (roter und oranger Kreis) sowie stationären Listerien (blauer Kreis). Nach 45 sek Aufnahme wurde die Zelle fixiert (letztes Einzelbild in a sowie vergrößert in b-e) und VASP (c) sowie F-Aktin (d) angefärbt. Die übereinandergelegten Fluoreszenzaufnahmen (e) zeigen eine Kolokalisation von Profilin und VASP nur an den beiden motilen Listerien (weiße Mischfarbe aus grün dargestelltem Profilin II-GFP, blau dargestelltem VASP und rot dargestelltem F-Aktin), während an den stationären Bakterien nur VASP und F-Aktin (violette Mischfarbe) zu erkennen sind. Die Zeit in Sekunden ist in der unteren rechten Ecke gezeigt. Der Balken entspricht 5 μm .

3.8 Profilin wird durch Ena/VASP-Proteine zu motilen Listerien rekrutiert

Die Tatsache, dass stationäre Listerien kein Profilin rekrutieren, obwohl VASP auch hier entlang der Zellwand lokalisiert, wirft die Frage auf, ob die Ena/VASP-Proteine wirklich für die Profilinrekrutierung verantwortlich sind.

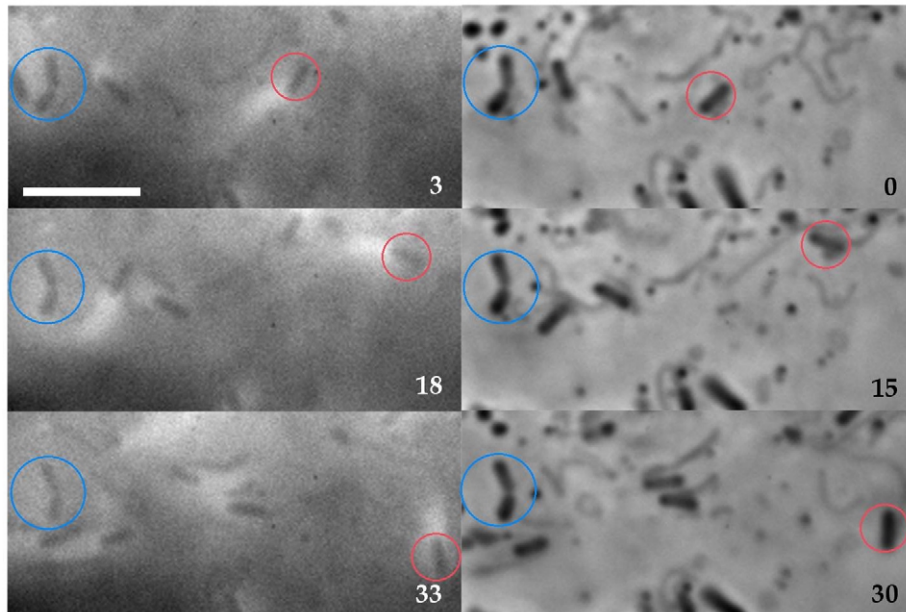


Abbildung 17: Ena/VASP-Proteine vermitteln die Rekrutierung von Profilin zu *Listeria monocytogenes*

Videomikroskopiesequenz einer Profilin II-GFP exprimierenden PtK2 Zelle, die mit *Listeria monocytogenes* Δ ActA5 infiziert wurde. Diese Listerien können keine Ena/VASP-Proteine rekrutieren. Auf der linken Seite sind Fluoreszenzaufnahmen und auf der rechten Seite die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zu sehen. Profilin lokalisiert nicht in der von wt Listerien bekannten Weise an motilen Listerien (roter Kreis) und auch nicht an Stationären (blauer Kreis). Die Zeit in Sekunden ist in der unteren linken rechten Ecke gezeigt. Der Balken entspricht 5 μ m.

Um zu überprüfen, ob die Profilinlokalisierung an motilen Listerien von der Rekrutierung durch Ena/VASP-Proteine abhängt, wurden Profilin II-GFP exprimierende Zellen mit der isogenen Listerien Δ ActA5-Mutante* infiziert. Diese Listerien exprimieren ein ActA, dem die zentralen FP₄-Motive fehlen, die für die

* *Listeria monocytogenes* Δ ActA5 wurde von Prof. Dr. Trinad Chakraborty und Dr. Eugen Domann, Universität Gießen, zur Verfügung gestellt (Niebuhr *et al.*, 1997).

Ena/VASP-Rekrutierung verantwortlich sind. Sie können somit keine Ena/VASP-Proteine mehr rekrutieren und bewegen sich durchschnittlich mit reduzierter Geschwindigkeit (Niebuhr *et al.*, 1997).

An der Zellwand der Δ ActA5 Listerien konnte auch beim Erreichen einer Geschwindigkeit, bei der wt Listerien in ähnlich stark transfizierten Zellen Profilin II-GFP bereits rekrutierten, dieses nicht nachgewiesen werden (Abbildung 17). Dies belegt, dass das Profilin II-GFP während der aktinvermittelten listeriellen Bewegung wirklich durch Ena/VASP-Proteine rekrutiert wird, diese Interaktion jedoch nur bei motilen Listerien stattfindet.

3.9 In Ena/VASP-freien Zellen ist die Listerienmotilität stark eingeschränkt

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass Ena/VASP-Proteine essentiell für die Rekrutierung von Profilin zu intrazellulären Listerien sind. Sie zeigen darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Profilinrekrutierung und der Listerienmotilität auf, was auf eine mögliche Regulation der Profilinrekrutierung auf Ebene der Ena/VASP-Proteine schließen lässt. Damit erweitern sie die bisherige Modellvorstellung der Listerienmotilität (s. 1.4.3). Mit weiteren Experimenten sollte nun untersucht werden, welche Ena/VASP-Proteindomänen die Listerienmotilität beeinflussen und ob deren Aktivität einer Regulation durch Phosphorylierung unterliegen.

Für eine derartige Analyse war ein zellulärer Hintergrund ohne endogene Ena/VASP-Proteine notwendig. Diese Voraussetzung wurde in der klonalen Mausfibroblastenlinie MV^{D7} verwirklicht, die frei von allen in Mäusen nachgewiesenen Ena/VASP-Proteinen war. Diese Zelllinie wurde aus den homozygoten Doppel-“knockout“ Embryos von Mena- und VASP-“knockout“ Mäusen isoliert und durch Transfer des “SV 40 large-T-antigen“-Gens immortalisiert. Eine Expression von dem vor allem in neuronalen Zellen vorkommenden Evl konnte nicht nachgewiesen werden (Bear *et al.*, 2000).

Die MV^{D7} Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* infiziert, fünf Stunden nach der

Infektion fixiert und die Aktinfilamente sowie die Listerien angefärbt. Die Listerien waren größtenteils in Mikrokolonien anzutreffen, verteilten sich also nur sehr langsam in der Zelle. Dementsprechend akkumulierten sie zwar F-Aktin entlang ihrer Zellwand, bildeten aber nur vereinzelt kurze Schweife (Abbildung 18a). In parallel infizierten PtK2 Zellen bildeten viele Listerien lange Schweife und konnten sich effektiv im gesamten Zytoplasma verteilen (Abbildung 18b). Die Schweife der wt Listerien in den MV^{D7} Zellen ähneln morphologisch denen von *Listeria monocytogenes* Δ ActA5 in PtK2 Zellen (Abbildung 18d). Diese Listerien können die endogenen Ena/VASP-Proteine nicht rekrutieren (vergleiche mit 3.8) und zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die wt Listerien in den Ena/VASP-Protein freien Zellen. Übereinstimmend verhielt sich *Listeria monocytogenes* Δ ActA5 in MV^{D7} Zellen (Abbildung 18c).

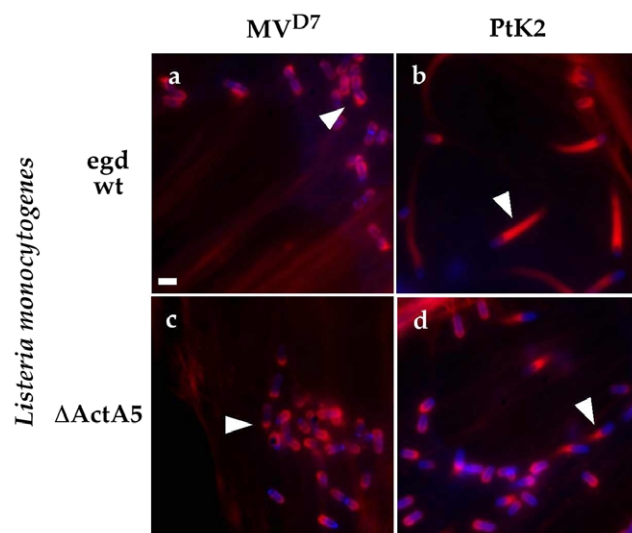


Abbildung 18: Vergleich von *Listeria monocytogenes* EGD wt mit *Listeria monocytogenes* Δ ActA5 in MV^{D7} und PtK2 Zellen

MV^{D7} und PtK2 Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt oder *Listeria monocytogenes* Δ ActA5 infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und das Aktinzytoskelett (rot) sowie die Listerien (blau) angefärbt. Während *Listeria monocytogenes* EGD wt in MV^{D7} Zellen nur vereinzelt kurze Schweife ausbildet (**a**), werden sie in PtK2 Zellen wesentlich länger (**b**), was auf eine deutlich reduzierte Listerienmotilität in den Ena/VASP-freien MV^{D7} Zellen hindeutet. *Listeria monocytogenes* Δ ActA5, die keine Ena/VASP-Proteine rekrutieren können, bilden sowohl in MV^{D7} Zellen (**c**) als auch in PtK2 Zellen (**d**) nur kurze Schweife aus, die denen der wt Listerien in MV^{D7} Zellen ähneln. Der Balken entspricht einer Länge von 1 μ m.

Die MV^{D7} Zellen erlauben den Listerien aufgrund der Abwesenheit von Ena/VASP-Proteinen erwartungsgemäß nur eine geringe Motilität, die denen von *Listeria monocytogenes* Δ ActA5 in PtK2 Zellen mit endogenen Ena/VASP-Proteinen ähnelt. Im nächsten Schritt sollten nun Ena/VASP-Proteine in diesen Zellen exprimiert und dadurch die Listerienmotilität rekonstituiert werden.

3.10 Die Listerienmotilität wird durch Mena und VASP gleichermaßen gefördert

Die sehr geringe Motilität der Listerien in MV^{D7} Zellen müsste sich durch die Expression von VASP oder Mena steigern lassen. GFP-Mena oder GFP-VASP sollten hierzu mittels retroviralen Gentransfer stabil in den MV^{D7} Zellen exprimiert werden.

Die GFP-Mena exprimierenden MV^{D7} Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Gertler* zur Verfügung gestellt. GFP-VASP wurde in den retroviralen Transfervektor pMSCV kloniert, indem es aus pEGFP-C2+VASP (Carl *et al.*, 1999) PCR amplifiziert (Tabelle 9), das PCR-Produkt mit EcoRI und ClaI verdaut und anstelle von GFP-Mena in pMSCV+EGFP-Mena (Bear *et al.*, 2000) ligiert wurde.

| | |
|-----------|---------------------------------|
| vorwärts | CGGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC |
| rückwärts | GCATCGATTCAGGGAGAACCCGCTTCCTCAG |

Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung von pMSCV+EGFP-VASP

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer für den kodierenden (vorwärts) und den komplementären Strang (rückwärts). Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Das GFP-VASP wurde durch retroviralen Gentransfer stabil in das Genom der MV^{D7} Zellen integriert und im Durchflußzytometer eine Zellpopulationen aussortiert, die GFP-VASP in äquivalent hoher Menge wie in den bereits vorhandenen MV^{D7} GFP-Mena exprimierenden Zellen exprimierte. Dazu wurden die Populationsgrenzen analog der als Referenz vermessenden MV^{D7} GFP-Mena Zellen gesetzt. Ein späterer Vergleich der erzeugten MV^{D7} VASP wt mit der MV^{D7} Mena wt Population im Durchflußzytometer belegte die äquivalent hohen Expressionsraten (Abbildung 19a). Diese Expressionsrate entspricht ungefähr der von endogenen Ena/VASP-Proteinen in Ratten Fibroblasten (Bear *et al.*, 2000).

* Prof. Dr. F. Gertler, Biology, Massachusetts Institute of Technology, Boston MA, USA

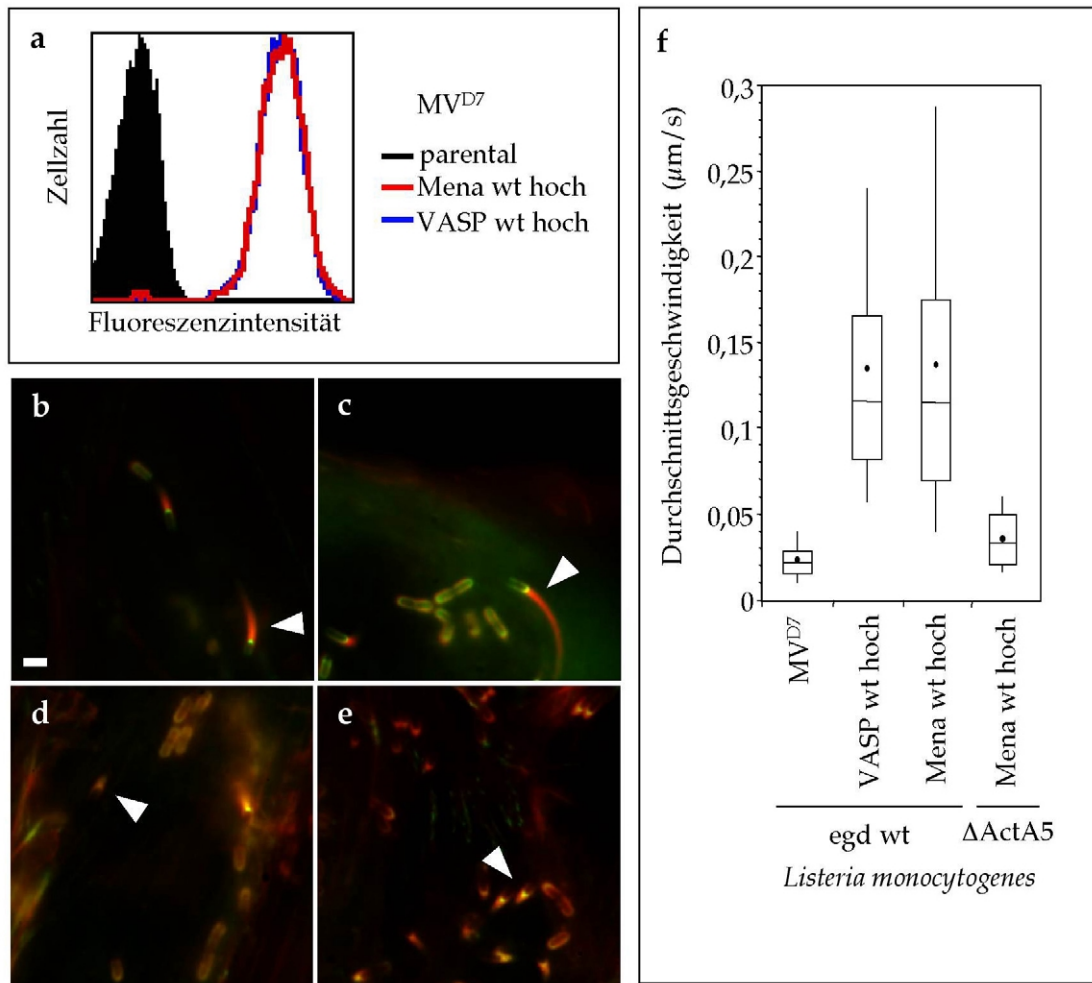


Abbildung 19: Die Listerienmotilität wird durch Mena und VASP gleichermaßen gefördert

Zwei verschiedene MV^{D7} Populationen exprimieren GFP-VASP wt bzw. GFP-Mena wt im äquivalent hohen Level, wie die Analyse im Durchflußzytometer anhand der sich überlagernden Graphen zeigt (**a**). In schwarz ist die Verteilung der Hintergrundfluoreszenz der parental MV^{D7} Zellpopulation, in rot die von MV^{D7} Mena wt im hohen Level und in blau die von MV^{D7} VASP wt im hohen Level dargestellt. Diese Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt oder *Listeria monocytogenes* ΔActA5 infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und das Aktinzytoskelet gefärbt (rot). *Listeria monocytogenes* EGD wt bildete in MV^{D7} GFP-Mena (**b**) und MV^{D7} GFP-VASP (**c**) Zellen lange Schweife, während *Listeria monocytogenes* ΔActA5 in MV^{D7} GFP-Mena (**d**) und MV^{D7} GFP-VASP wt (**e**) Zellen nur kurze Schweife produzierte, in denen auch VASP bzw. Mena angereichert war (gelbe Mischfarbe). Der Balken entspricht einer Länge von 1μm. Die Listerienmotilität wird im "box and whiskers" Diagramm dargestellt (**f**). Der Punkt kennzeichnet das geometrische Mittel aller Messwerte. Die Ausdehnung der "box" und der "whiskers" um den Median (Balken) geben die Verteilung der gemessenen Durchschnittsgeschwindigkeiten wieder. Die gemessenen Listeriengeschwindigkeiten in den GFP-VASP wt und GFP-Mena wt exprimierenden MV^{D7} Populationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander aber deutlich von denen der wt Listerien in den parental MV^{D7} Zellen oder denen der ΔActA5 Listerienmutante in MV^{D7} GFP-Mena Zellen.

Die so entstandenen Zellpopulationen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt oder der ΔActA5 Listerienmutante infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und die Aktinfilamente angefärbt. *Listeria monocytogenes* bildete sowohl in MV^{D7}

Mena wt (Abbildung 19b) als auch in MV^{D7} VASP wt (Abbildung 19c) lange Aktinschweife, die sich morphologisch nicht von denen in PtK2 Zellen unterscheiden ließen (vergleiche Abbildung 18b). Bei der Kontrollinfektion mit der Listerienmutante Δ ActA5 hingegen bildeten sich nur die bekannten kurzen Schweife (Abbildung 19d, e), die ebenfalls denen in PtK2 Zellen ähneln (vergleiche Abbildung 18d).

Um die Listerienmotilität quantifizieren zu können, wurden Videomikroskopiesequenzen von Listerien in den parental MV^{D7} Zellen und in den wt Mena und wt VASP exprimierenden MV^{D7} Populationen hergestellt und die Durchschnittsgeschwindigkeiten der motilen Listerien bestimmt (s. 2.10.2). Während sich die Listerien in den parental MV^{D7} Zellen mit sehr niedrigen Geschwindigkeiten bewegten, erreichten sie in den wt Mena und wt VASP exprimierenden Zellen wesentlich höhere Geschwindigkeiten (Abbildung 19f). Sowohl der Gesamtdurchschnitt als auch die Variabilität der Geschwindigkeiten war deutlich gesteigert. Dabei fördern VASP und Mena die Listerienmotilität gleichermaßen, da zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht (s. Tabelle 16).

In denselben wt Mena exprimierenden MV^{D7} Zellen reicherten die Δ ActA5 Listerien im Gegensatz zu den wt Listerien in ihren kurzen Schweifen deutlich VASP bzw. Mena an (Abbildung 19d, e), und ihre Motilität war etwas größer als die Motilität der wt Listerien in den parental MV^{D7} Zellen (Abbildung 19f).

3.11 Die exprimierte Ena/VASP-Menge bedingt die Geschwindigkeit der Listerien

Von den GFP-Mena exprimierenden MV^{D7} Zellen wurden im Durchflußzytometer zwei weitere Populationen aussortiert, die GFP-Mena im Vergleich zu der hoch exprimierenden Population in niedriger und in mittlerer Stärke exprimierten. Der Vergleich dieser Populationen im Durchflußzytometer zeigte die relativen Unterschiede in der Expressionsrate (Abbildung 20a).

Wiederum wurden die Durchschnittsgeschwindigkeiten der motilen Listerien bestimmt. Die graphische Darstellung zeigt, dass die Listerienmotilität mit der exprimierten Mena Menge korreliert (Abbildung 20e).

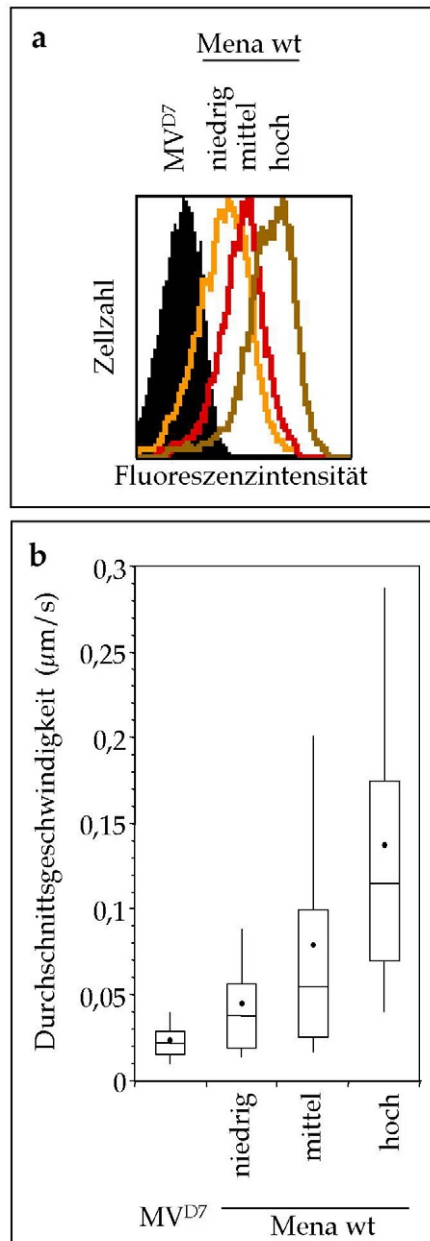


Abbildung 20: Die Listerienmotilität korreliert mit der Ena/VASP-Menge

MV^{D7} Populationen, die GFP-Mena wt in niedrigen, mittleren und hohen Mengen exprimierten, wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert und die Listeriengeschwindigkeit in Videomikroskopiesequenzen gemessen. Die Analyse dieser Zellpopulation im Durchflußzytometer (a) zeigt die relativen Unterschiede in der Mena Expression. Mit steigender Menge des exprimierten Mena erhöhen sich die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der Listerien (b).

In den folgenden Experimenten sollte nun die Listerienmotilität in MV^{D7} Populationen analysiert werden, die Ena/VASP-Mutanten stabil in einem hohen Level exprimieren, der äquivalent zum zuvor verwendeten hohen wt Mena und wt VASP Level ist.

3.12 Ena/VASP-Mutanten

Alle Mutanten wurden wie die wt Proteine als aminoterminal Fusionen mit GFP konstruiert, um sie lokalisieren und die Expression quantifizieren zu können. Ein "alignment" der klonierten Ena/VASP-Proteine zeigt die hoch konservierten Sequenzbereiche (Abbildung 21), die teilweise bereits *in vitro* charakterisiert wurden.

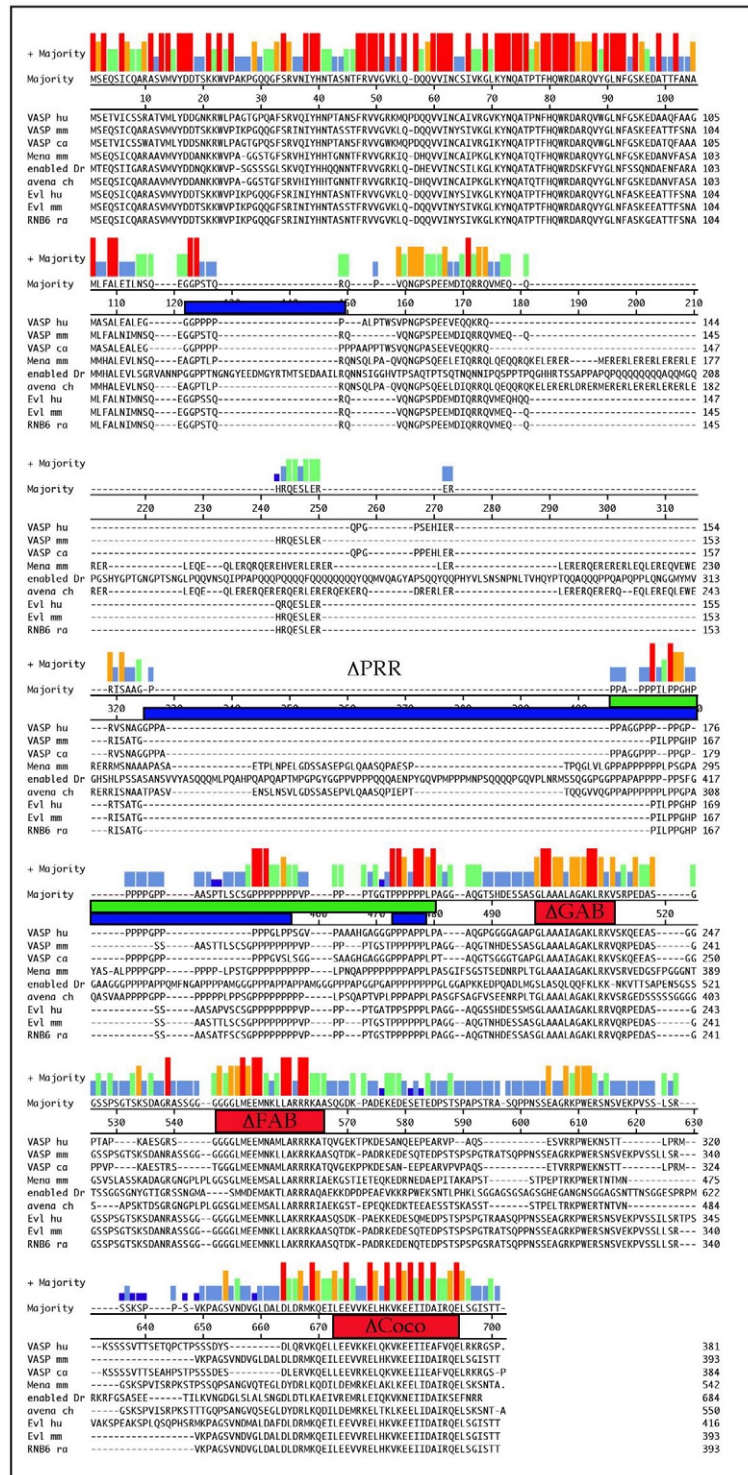


Abbildung 21:
"alignment" der
Ena/VASP-Proteine

Die klonierten Ena/ VASP-Proteine wurden in folgender Reihenfolge angeordnet: humanes VASP, Maus VASP, Hunde VASP, Maus Mena, Drosophila enabled, Hühner Avena, humanes Evl, Maus Evl und Ratten RNB6. Ein derartiges "alignment" wurde teilweise von Bachmann *et al.* (2000) publiziert. Hohe rote und orange Balken über der Konsensussequenz symbolisieren eine große Übereinstimmung, während Bereiche mit geringer Übereinstimmung durch niedrige grüne und blaue Balken gekennzeichnet sind. Die deletierten Bereiche sind durch Querbalken markiert. Die Deletionen der EVH2-Domäne gleichen sich in Mena und VASP (rot). Die deletierten Prolinreichen Regionen von VASP sind blau und von Mena grün gekennzeichnet.

Die Struktur der zentralen Prolin-reichen Regionen ist innerhalb der Ena/VASP-Proteine sehr unterschiedlich. Die komplett deletierte große Prolin-reiche Region von Mena (Tabelle 10: Mena Δ PRR) enthält vier potentiell Profilin bindende XP_5 -Motive (Abbildung 21). In VASP wurde die zentrale GPPAPPPAG(GP_5)₃ Region (Tabelle 11: VASP Δ GP₅) und zusätzlich zwei weitere isolierte GP_5 bzw. GPPPAPP-Motive deletiert (Tabelle 11: VASP Δ PRR, Abbildung 22a).

Die EVH2-Domäne der Ena/VASP-Proteine weist im Gegensatz zur EVH1-Domäne nur kleinere hoch konservierte Abschnitte auf, die von weniger stark konservierten Bereichen unterbrochen werden (Abbildung 21). Eine hoch konservierte Region enthält ein aus Thymosin- β 4 bekanntes Konsensusmotiv, das hier für die G-Aktinbindung verantwortlich ist (s. 1.3.3). Diese potentielle G-Aktin-Bindungsdomäne wurde in Mena deletiert (Tabelle 10: Mena Δ GAB, Abbildung 22a). Chemisches “crosslinking“, Gradientensedimentation und Gelfiltrationsanalysen identifizierten eine EVH2-Subdomäne, die *in vitro* essentiell und ausreichend für eine VASP Tetramerisierung, wahrscheinlich durch die Ausbildung einer “coiled coil“ Struktur, ist. Kosedimentationsexperimente und *in vitro* Aufnahmen mit fluoreszierendem F-Aktin charakterisierten eine EVH2-Subdomäne, die essentiell für die F-Aktinbindung ist (Bachmann *et al.*, 1999). Diese beiden Regionen wurden in VASP und in Mena deletiert und mit Δ Coco (“coiled coil“-Region) bzw. Δ FAB (F-Aktin Bindung) bezeichnet (Tabelle 10, Tabelle 11, Abbildung 22a).

In VASP wurden drei und in Mena zwei konservierte Phosphorylierungsstellen identifiziert (s.1.3.7, Abbildung 1). Entsprechend ihrer Konservierung in der Ena/VASP-Familie wurden Mutationen an dem aminoterminalen Serin allein, an beiden Serinen und bei VASP an allen drei Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Dabei wurden die Phosphorylierungsstellen entweder durch Alanin(e) oder Asparaginsäure(n) ersetzt. Durch die Substitution mit Alanin sollten ungeladene Aminosäuren eingebaut werden, was dem nicht phosphorylierten Zustand entspricht, und die Substitution mit der negativ geladenen Asparaginsäure sollte den phosphorylierten Zustand simulieren. Diese Mutanten wurden mit Mena AS, AA bzw. DS, DD und VASP AST, AAT, AAA bzw. DST, DDT, DDD bezeichnet, was die Reihenfolge der substituierten Phosphorylierungsstellen zu Alanin (A) oder Asparaginsäure (D) wiedergibt (Tabelle 10, Tabelle 11, Abbildung 22a).

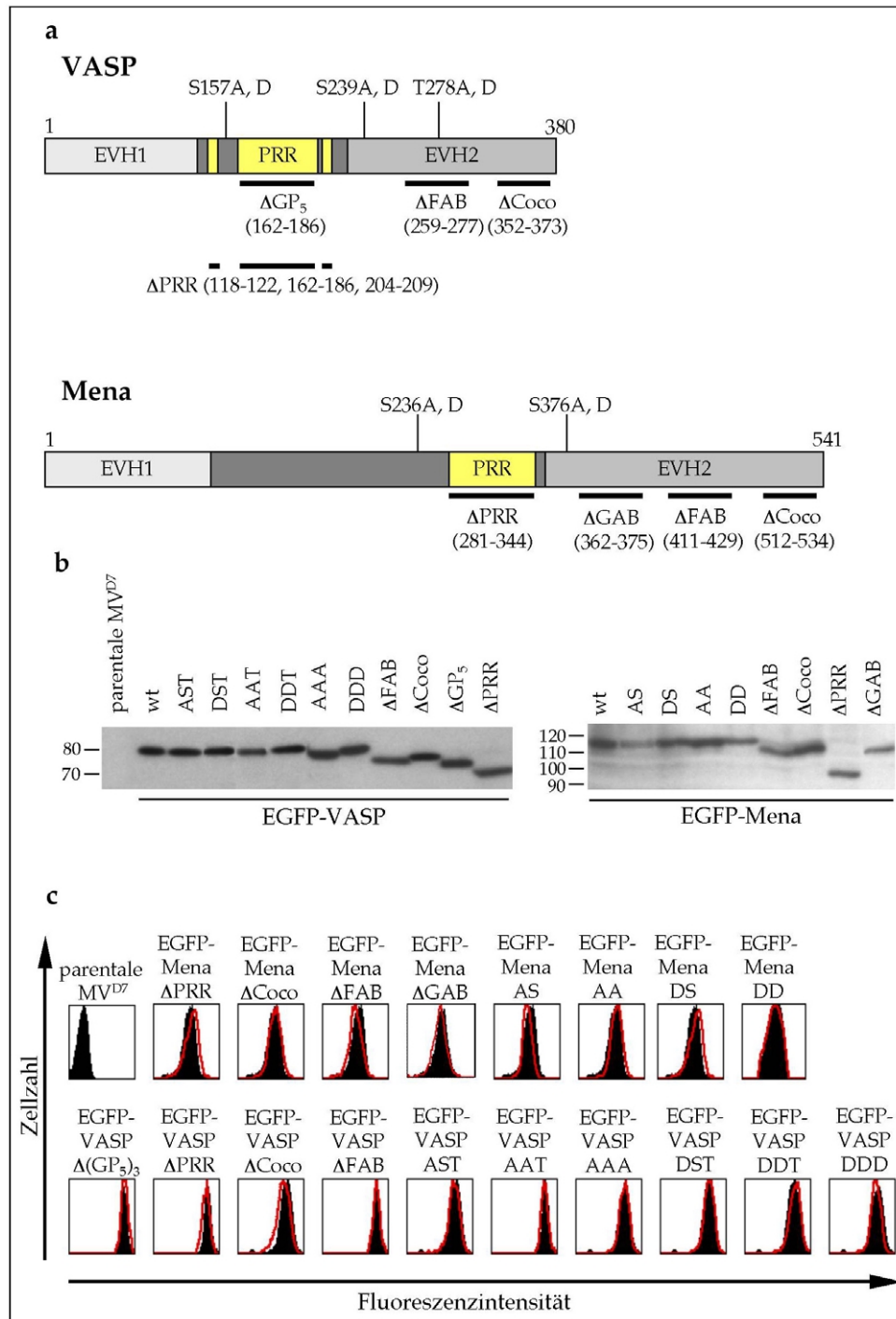


Abbildung 22: VASP und Mena Mutanten

Schematische Darstellung der VASP und Mena Mutanten (a). Es werden jeweils die mutierten Phosphorylierungsstellen und, gekennzeichnet durch schwarze Balken, die deletierten Bereiche gezeigt. Die Nummerierung gibt die Position der Aminosäuren wieder. Immunoblot der Mutanten (b). Zellextrakte wurden im SDS-PAGE Verfahren aufgetrennt, geblottet und die GFP markierten Mena/VASP-Proteine mit einem Antikörper gegen GFP detektiert. Alle Proteine zeigen die erwarteten Größen. Degradationsprodukte waren nicht nachweisbar. Scan der hoch exprimierenden Zellpopulationen im Durchflußzytometer (c). Die Histogramme zeigen schwarz die Referenzzellpopulation, also GFP-VASP wt oder GFP Mena wt, und rot überlagert die getesteten Zellpopulation mit mutierten Mena/VASP-Proteinen. Es lassen sich keine relevanten Unterschiede im Expressionsmuster der verglichenen Populationen feststellen.

| | |
|------------------------|--|
| GFP-Mena | wt (1-541) |
| GFP-Mena Δ PRR | Deletion der Prolin-reichen Region 281-344 |
| GFP-Mena Δ GAB | Deletion der potentiell G-Aktin bindenden Region der EVH2-Domäne 362-375 |
| GFP-Mena Δ FAB | Deletion der F-Aktin bindenden Region der EVH2-Domäne 411-429 |
| GFP-Mena Δ Coco | Deletion der Multimerisierungsdomäne der EVH2-Domäne 512-534 |
| GFP-Mena AS | Austausch des Serin 236 gegen Alanin |
| GFP-Mena DS | Austausch des Serin 236 gegen Asparaginsäure |
| GFP-Mena AA | Austausch der Serine 236 und 376 gegen Alanin |
| GFP-Mena DD | Austausch der Serine 236 und 376 gegen Asparaginsäuren |

Tabelle 10: Mena Konstrukte

| | |
|-----------------------------------|--|
| GFP-VASP | wt (1-380) |
| GFP-VASP Δ GP ₅ | Deletion der mittleren Prolin-reichen Region 162-186 |
| GFP-VASP Δ PRR | Deletion aller Prolin-reichen Regionen 118-122, 162-186, 204-209 (Die dazwischen liegenden Aminosäuren wurden erhalten.) |
| GFP-VASP Δ FAB | Deletion der F-Aktin bindenden Region der EVH2 Domäne 259-277 |
| GFP-VASP Δ Coco | Deletion der Multimerisierungsdomäne der EVH2 Domäne 352-373 |
| GFP-VASP AST | Austausch des Serin 157 gegen Alanin |
| GFP-VASP DST | Austausch des Serin 157 gegen Asparaginsäure |
| GFP-VASP AAT | Austausch der Serine 157 und 239 gegen Alanine |
| GFP-VASP DDT | Austausch der Serine 157 und 239 gegen Asparaginsäuren |
| GFP-VASP AAA | Austausch der Serine 157 und 239 sowie des Threonin 278 gegen Alanine |
| GFP-VASP DDD | Austausch der Serine 157 und 239 sowie des Threonin 278 gegen Asparaginsäuren |

Tabelle 11: VASP Konstrukte

Alle verwendeten Mena Konstrukte und die damit rekonstituierten MV^{D7} Populationen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Gertler* am MIT hergestellt. Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die verwendeten Mena Konstrukte. Alle VASP Mutanten wurden im Zuge dieser Arbeit hergestellt und

* Prof. Dr. F. Gertler, Biology, Massachusetts Institute of Technology, Boston MA, USA

werden in der Tabelle 11 aufgelistet. Die Einzelheiten der Klonierung werden unten beschrieben (s. 3.13).

3.13 Klonierung der VASP-Mutanten und Rekonstitution der MV^{D7} Zellen

Die drei Phosphorylierungsstellen von VASP, die Serine an Position 157 und 239 sowie das Threonin an Position 278, wurden durch gerichtete Punktmutagenese mit Alanin oder Asparaginsäure substituiert. Die Mutagenese von VASP am S157 zu Alanin oder Asparaginsäure wird im folgenden mit VASP AST bzw. VASP DST, die Mutagenese am S239 mit VASP SAT bzw. VASP SDT und die Mutagenese am T278 mit VASP SSA bzw. VASP SSD bezeichnet.

Für die Mutagenesen wurde pMSCV+EGFP-VASP als “template“ und die folgenden Oligonukleotide (Tabelle 12) verwendet.

| | | |
|----------|-----------------|------------------------------------|
| VASP AST | S157A vorwärts | GCACATAGAGCGCCGGGTCGCCAATGCAGGAGGC |
| | S157A rückwärts | GCCTCCTGCATTGGCGACCCGGCGCTCTATGTGC |
| VASP DST | S157D vorwärts | CATAGAGCGCCGGGTCGACAATGCAGGAGGCC |
| | S157D rückwärts | GGCCTCCTGCATTGTGCGACCCGGCGCTCTATG |
| VASP SAT | S239A vorwärts | CTCAGGAAAGTCGCCAAGCAGGAGGAGGCC |
| | S239A rückwärts | GGCCTCCTCCTGCTTGGCGACTTTCCTGAG |
| VASP SDT | S239D vorwärts | CTCAGGAAAGTCGACAAGCAGGAGGAGGCC |
| | S239D rückwärts | GGCCTCCTCCTGCTTGTGCGACTTTCCTGAG |
| VASP SSA | T278A vorwärts | GGAGAAGGAAAGCCGCGCAAGTTGGGGAGAAAAC |
| | T278A rückwärts | GTTTTCTCCCCAACTTGCGCGGCTTTCCTTCTCC |
| VASP SSD | T278D vorwärts | GGAGAAGGAAAGCCGACCAAGTTGGGGAGAAAAC |
| | T278D rückwärts | GTTTTCTCCCCAACTTGGTCGGCTTTCCTTCTCC |

Tabelle 12: Oligonukleotide für die VASP-Phospho- und Dephosphomutanten

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer für den kodierenden (vorwärts) und den komplementären Strang (rückwärts). Die “codons“ für die substituierenden Aminosäuren sind unterstrichen.

Die Mutanten am S157 und S239 wurden zu den Serin Phosphomutanten kombiniert:

Um VASP AAT zu erhalten wurden zuerst pMSCV+EGFP-VASP AST und pMSCV+EGFP-VASP SAT mit EcoRI und ClaI verdaut. Die entstandenen EGFP-VASP Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und mit PstI verdaut, das zwischen den beiden Phosphorylierungsstellen schneidet. Abermals durch Gelelektrophorese wurden die mutierten von den nicht mutierten Fragmenten getrennt

und so kombiniert wieder in den pMSCV Vector ligiert, dass VASP AAT entstand. Entsprechend wurde VASP DDT kloniert.

Für die Klonierung der dreifachen Phospho- und Dephosphomutanten konnten keine passenden Restriktionsschnittstellen verwendet werden, weshalb Punktmutagenesen am T278 mit den Serin Mutanten als “template“ durchgeführt wurden, so dass VASP AAA und VASP DDD entstanden.

Die Deletionsmutagenese wurde mit der “overlap-extension“ PCR-Technik durchgeführt (Abbildung 7). Als “template“ wurde pMSCV+EGFP-VASP, bzw. für ΔPRR wurde pMSCV+EGFP-VASP ΔGP₅, verwendet. Die ubiquitär eingesetzten externen Primer der ersten PCR-Runde und die “nested“ Primer der zweiten PCR-Runde sowie die deletionsspezifischen Primer sind in der Tabelle 13 dargestellt.

| | | | |
|----------|---------------------------------------|-----------|--|
| 1. Runde | externe Primer | vorwärts | GCTGTACAAGTCCGGCCGGACTCAGATCTC |
| | | rückwärts | GTGGGGTCTTTCATTCCCCCTTTTCTGG |
| | VASP ΔGP ₅ (162-186) | vorwärts | CTCCAATGCAGGAGGCGGTTTGCCCCCTTCG |
| | | rückwärts | <u>CGAAGGGGGCAAACCGCCTCCTGCATTGGAG</u> |
| | VASP ΔPRR (118-122, 162-186, 204-209) | vorwärts | GTTGGAAGGAGGTGGGGCACTTCCCACCTGG |
| | | rückwärts | <u>CCAGGTGGGAAGTGCCCCACCTCCTTCCAAC</u> |
| | | vorwärts | <u>GGAGCAGGGGGAGGACTCCCGGCAGCACAG</u> |
| | | rückwärts | <u>CTGTGCTGCCGGGAGTCCTCCCCCTGCTCC</u> |
| | VASP ΔFAB (259-277) | vorwärts | <u>GAGAGTGGTCAAGCACGCAAGTTGGGGAG</u> |
| | | rückwärts | <u>CTCCCCAACTTGCGTGCTTCGACCACTCTC</u> |
| | VASP ΔCocö (352-373) | vorwärts | <u>GTGAAACAGGAGCTTCTGAGGAAGCGGGG</u> |
| | | rückwärts | <u>CCCCGCTTCCTCAGAAGCTCCTGTTTCAC</u> |
| 2. Runde | “nested“ Primer | vorwärts | GCT <u>CAAGCTTAG</u> CAGCCATGAGCGAGACGG |
| | | rückwärts | CTAAATAAAATCTTTTATTTTATCGATT <u>CAGG</u> |

Tabelle 13: Oligonukleotide für die VASP Deletionsmutagenese

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer für den kodierenden (vorwärts) und den komplementären Strang (rückwärts). In der ersten Runde wurden die externen Primer mit den jeweiligen deletionsspezifischen Primern eingesetzt. In der zweiten Runde wurden die “nested“ Primer verwendet. Die überlappenden Teile der deletionsspezifischen Primer und die Restriktionsschnittstellen der “nested“ Primer sind unterstrichen. Zur Herstellung von VASP ΔPRR wurden in der ersten Runde drei PCR-Reaktionen durchgeführt und alle drei Produkte in der zweiten PCR-Runde als Fusions-“template“ verwendet.

In der zweiten PCR-Runde wurden HindIII und ClaI Restriktionsschnittstellen an den Fragmentenden mit den “nested“ Primern eingeführt, mit denen die PCR Fragmente geschnitten und in dieselben Stellen des pMSCV Vektors ligiert wurden.

Um die Auswirkung der Mutation eines Ena/VASP-Proteins auf die Listeriengeschwindigkeit quantitativ analysieren zu können, mussten Zellpopulationen

hergestellt werden, die zur jeweiligen wt Referenz äquivalent hohe Ena/VASP-Mutanten Mengen exprimierten. Alle GFP-Mena exprimierenden Zellpopulationen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Gertler* hergestellt und alle GFP-VASP exprimierenden Zellpopulationen wurden innerhalb dieser Arbeit erzeugt. Die GFP-Mena und GFP-VASP Mutanten wurden mittels retroviralen Gentransfer stabil in das Genom der MV^{D7} Zellen eingebaut, wie in 3.10 beschrieben.

* Prof. Dr. F. Gertler, Biology, Massachusetts Institute of Technology, Boston MA, USA

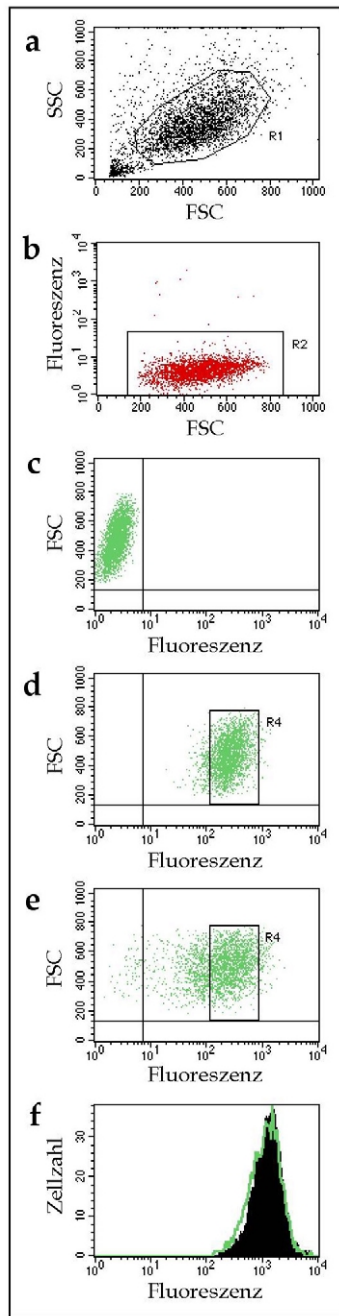


Abbildung 23: Durchflußzytometrie in der Herstellung äquivalent exprimierender Zellpopulationen

Am Beispiel der GFP-VASP Δ FAB Mutante ist die Prozedur zur Herstellung einer Population mit zur MV^{D7} GFP-VASP wt Population äquivalent hoher Expression im Durchflußzytometer dargestellt. In (a) sind die parental MV^{D7} Zellen gezeigt, die als Negativkontrolle verwendet wurden. FSC ("forward scatter") ist ein Maß für die Größe und SSC ("sideward scatter") ein Maß für die Granulität der Zellen. R1 (Region 1) ist die Hauptpopulation einzelner Zellen ohne Verklumpungen oder Bruchstücke. Die Propidiumiodid-Fluoreszenz (b) ermöglichte das Abtrennen der toten Zellen, die außerhalb R2 liegen. Die Hintergrundfluoreszenz der parental MV^{D7} Zellen unter GFP-Anregung ist in (c), und die als Referenz dienende MV^{D7} GFP-VASP wt Population mit hoher Expression in (d) dargestellt. R4 wurde so angepasst, dass 95 % der Referenz-Zellen um den Median eingebunden sind. Die GFP-VASP Δ FAB exprimierenden Zellen wurden nun aussortiert, die gleichermaßen für R1, R2 und R4 positiv waren (e). Der spätere Vergleich (f) der ursprünglichen wt Referenz (schwarz im Hintergrund) und der entstandenen hoch exprimierenden MV^{D7} GFP-VASP Δ FAB Population (rot) demonstriert die hervorragende Übereinstimmung beider Populationen.

Die Ena/VASP-Mutanten exprimierenden MV^{D7} Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie in äquivalent hoch exprimierende Populationen sortiert. Die gesetzten Populationsgrenzen wurden innerhalb der GFP-Mena Konstrukte bzw. innerhalb aller GFP-VASP Konstrukte einheitlich gewählt (Abbildung 23). Nach Expansion wurden die Zellen in Aliquots eingefroren und erst direkt vor Verwendung wieder aufgetaut. Nach einer Kulturzeit von etwa drei Wochen, die auch für die Geschwindigkeitsmessungen notwendig war, wurde die GFP-Fluoreszenzintensität der Zellpopulationen erneut in einem Durchflußzytometer gemessen. Die Vergleiche zwischen der Referenz und den Ena/VASP-Mutanten Populationen belegten, dass

nach dieser Zeit kein relevanter Unterschied bezüglich der Expression zu erkennen ist (Abbildung 22c).

Von allen Zellpopulationen wurden Zellextrakte hergestellt und im Immunoblot die exprimierten GFP-VASP und GFP-Mena Konstrukte mit einem Antikörper gegen GFP detektiert (Abbildung 22b). Sowohl von VASP als auch von Mena ist bekannt, dass ihre Mobilität in SDS-PAGE deutlich geringer ist als die theoretisch berechnete (Butt *et al.*, 1994, Gertler *et al.*, 1996). So migrierten alle GFP-Fusionsproteine mit der erwarteten Größe im SDS-PAGE, und es waren keine Degradationsprodukte nachweisbar. Dies zeigt, dass die mutierten Proteine nicht in ihrer Stabilität beeinträchtigt waren.

3.14 Lokalisation der Mena und VASP Konstrukte in MV^{D7} Zellen

Von allen hergestellten Zellpopulationen wurden Zellen, auch mit *Listeria monocytogenes* infizierte, fixiert und das F-Aktin Zytoskellet angefärbt, um festzustellen, ob sich die Lokalisation der VASP- und Mena-Mutanten von der der wt Proteine unterschied.

| | “focal-adhesions“ | Lamellipodium-front und Filopodium-spitze | punktiert auf Stressfasern | Zytoplasma | Zellkern | <i>Listeria monocytogenes</i> |
|---------------------------|-------------------|---|----------------------------|------------|----------|-------------------------------|
| GFP-Mena wt | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-Mena AS | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-Mena DS | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-Mena AA | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-Mena DD | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-Mena ΔPRR | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-Mena ΔGAB | ++ | - | + | ++ | - | +++ |
| GFP-Mena ΔFAB | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-Mena ΔCoco | ++ | - | + | ++ | - | +++ |
| GFP-VASP wt | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP AST | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP DST | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP AAT | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP DDT | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP AAA | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP DDD | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP ΔGP ₅ | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP ΔPRR | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP ΔFAB | +++ | +++ | +++ | + | - | +++ |
| GFP-VASP ΔCoco | ++ | - | + | ++ | ++ | +++ |

Tabelle 14: Lokalisation der GFP-VASP und GFP-Mena Konstrukte in MV^{D7} Zellen

Lokalisation: - = nicht nachweisbar, + = schwach, ++ = stark, +++ = sehr stark.

GFP-VASP wt reichert sich stark in “focal adhesions”, an der Lamellipodienfront sowie an der Spitze von Filopodien an und dekoriert punktiert Stressfasern (Abbildung 24a). Es ist außerdem ein leichter Hintergrund im Zytoplasma zu erkennen. GFP-Mena wt und die meisten anderen GFP-VASP und GFP-Mena Mutanten lokalisierten in derselben Weise (Tabelle 14). Die einzigen Ausnahmen bildeten die Coco- und die Mena GAB-Deletionen. Während die Lokalisation in “focal adhesions“ und auf Stressfasern wesentlich schwächer zu erkennen waren, ließen sich die so mutierten Ena/VASP-Proteine in Lamellipodienfronten und Filopodien spitzen nicht mehr nachweisen. Stattdessen befand sich ein stark fluoreszierender Anteil im Zytoplasma und bei GFP-VASP ΔCoco auch im Zellkern (Abbildung 24b). Alle Konstrukte wurden von *Listeria monocytogenes* gradientartig rekrutiert (Abbildungen s.u.).

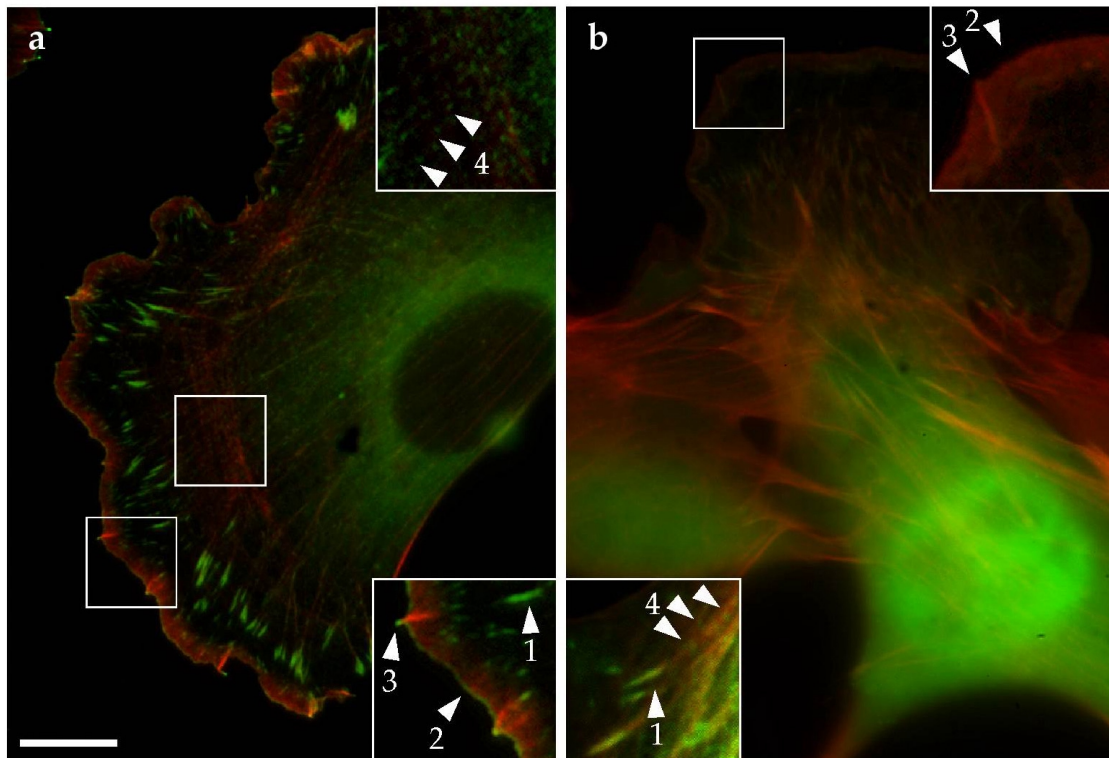


Abbildung 24: Lokalisation von GFP-VASP und GFP-VASP Δ Coco in MV^{D7} Zellen

MV^{D7} GFP-VASP wt (a) und MV^{D7} GFP-VASP Δ Coco Zellen (b) wurden fixiert und das Aktinzytoskelet mit Phalloidin (rot) angefärbt. Die Rahmen markieren die zweifach vergrößerte Bildausschnitte (Vergrößerung in b unten aus anderer Zelle). Die Pfeile weisen auf “focal adhesions” (1), die Lamellipodienfront (2), die Filopodienspitzen (3) und die Stressfasern (4) hin. Während in (a) ein zytoplasmatischer Hintergrund kaum zu erkennen ist, tritt er in (b) deutlich stärker hervor. Hier ist auch eine Kernlokalisierung zu erkennen, während die Lokalisation in “focal adhesions” und auf Stressfasern schwächer und in der Lamellipodienfront und den Filopodienspitzen nicht mehr vorhanden ist. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

3.15 Die Prolin-reichen Regionen der Ena/VASP-Proteine sind essentiell für die effiziente Listerienmotilität

Eine Funktion der Ena/VASP-Proteine liegt in der Rekrutierung von Profilin durch die Prolin-reichen Regionen (s. 1.3.7). Die Deletion dieser Motive sollte die Profilin:Aktin-Rekrutierung verhindern und so den fördernden Effekt der Ena/VASP-Proteine auf die Listerienmotilität aufheben.

MV^{D7} Zellen, die GFP-Mena Δ PRR, GFP-VASP Δ PRR oder GFP-VASP Δ GP₅ in hohem Level exprimierten, wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert und

nach Fixierung das Aktinzytoskelett angefärbt. In den MV^{D7} Zellen mit GFP-VASP Δ PRR oder GFP-Mena Δ PRR bildeten die Listerien nur kurze Schweife (Abbildung 25a und b), die denen von wt Listerien in den parental MV^{D7} Zellen ähnelten. In MV^{D7} GFP-VASP Δ GP₅ exprimierenden Zellen fanden sich deutlich längere Schweife (Abbildung 25c). Dies ließ darauf schließen, dass die Listeriengeschwindigkeit zumindest in den Zellen, die ein Ena/VASP-Protein mit kompletter Deletion aller Prolin-reichen Regionen exprimierten, deutlich reduziert war.

Bestätigt wurde dieser Eindruck durch die Geschwindigkeitsmessungen von motilen Listerien in videomikroskopischen Aufnahmen. Die komplette Deletion der Prolin-reichen Regionen in VASP und Mena führte zu einer starken Reduktion der Listerienmotilität, die alleinige GP₅ Deletion in VASP nur zu einer geringen, dennoch signifikanten, Reduktion (Abbildung 25d). Dies belegt eindeutig die essentielle Rolle der Prolin-reichen Regionen der Ena/VASP-Proteine für die effiziente Listerienmotilität.

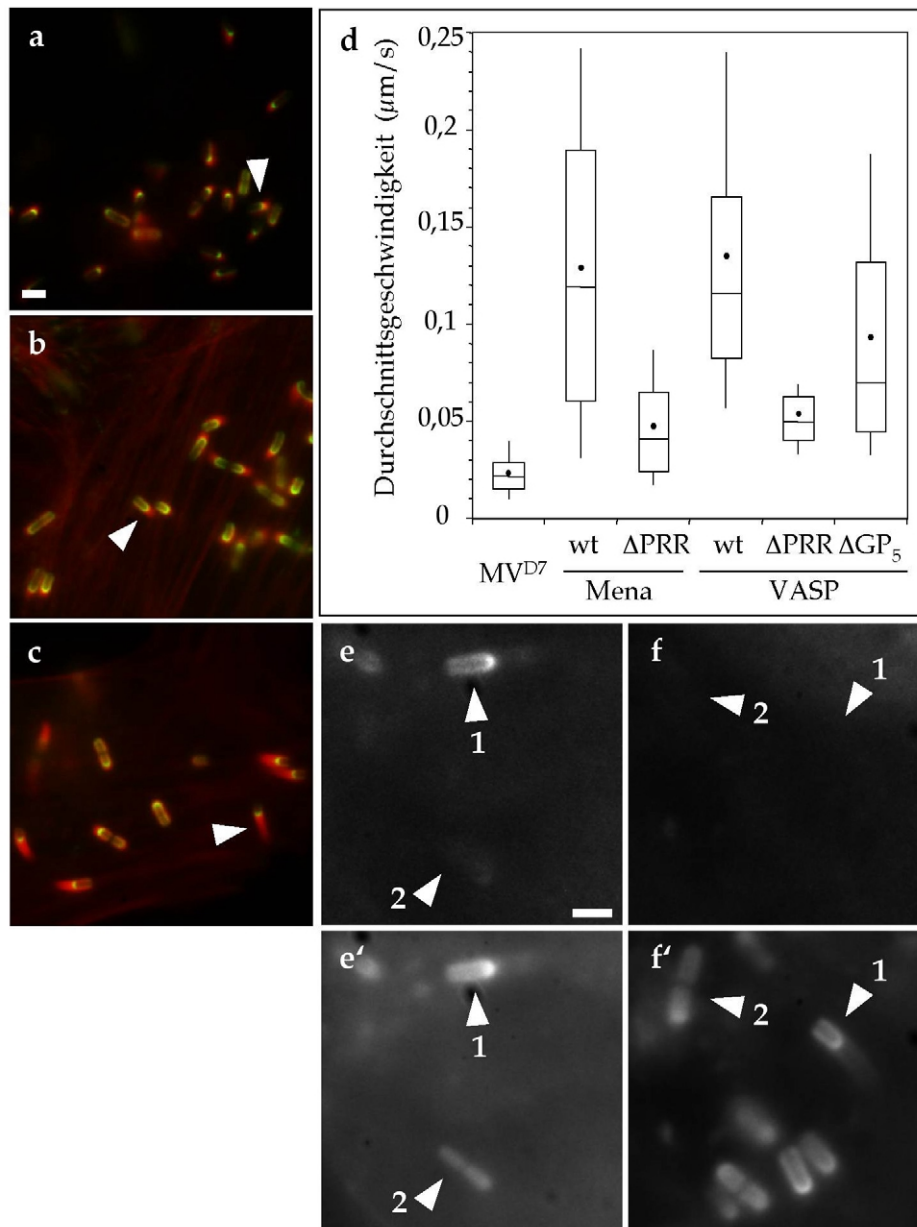


Abbildung 25: Die Prolin-reichen Regionen der Ena/VASP-Proteine sind essentiell für die effiziente Listerienmotilität

MV^{D7} Zellen, die GFP-Mena ΔPRR, GFP-VASP ΔPRR oder GFP-VASP ΔGP₅ im hohen Level exprimierten, wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und das Aktinzytoskellet gefärbt. In MV^{D7} GFP-Mena ΔPRR (a) und MV^{D7} GFP-VASP ΔPRR (b) bildeten die Listerien sehr kurze Schweife, während sie in den GFP-VASP ΔGP₅ Zellen deutlich länger werden konnten (c). Der Balken entspricht einer Länge von 1 μm. Die Geschwindigkeitsmessungen zeigten, dass sich die Listerienmotilität in GFP-Mena ΔPRR und GFP-VASP ΔPRR exprimierenden Zellen deutlich reduziert, während sie in den GFP-VASP ΔGP₅ exprimierenden Zellen nur leicht reduziert war (d). In MV^{D7} Zellen, die CFP-VASP (e') und Profilin II-YFP (e) exprimieren, rekrutieren die motilen Listerien (1) das Profilin während die Stationären (2) nur VASP rekrutieren. Bei gleichzeitiger Expression von CFP-VASP ΔPRR (f') und Profilin II-YFP (f) rekrutieren sowohl die motilen (1) als auch die stationären Listerien (2) nur die VASP-Mutante aber nicht das Profilin.

Um eine simultane Beobachtung von VASP und Profilin in MV^{D7} Zellen zu ermöglichen, wurden sie anstelle des GFP mit cyan bzw. gelb fluoreszierenden GFP-Varianten markiert. Hierzu wurden der ORF des ECFP (enhanced cyan fluorescing protein) aus pECFP-C1 als “template“ PCR amplifiziert (Tabelle 15). Das PCR-Produkt wurden mit EcoRI und HindIII geschnitten und anstelle des EGFP in pMSCV+EGFP-VASP und pMSCV+EGFP-VASP ΔPRR ligiert, so dass pMSCV+ECFP-VASP und pMSCV+ECFP-VASP ΔPRR entstanden. Profilin II-GFP wurde aus pEGFP-N1+Profilin II PCR-amplifiziert, und mit den eingeführten NotI und HindIII Schnittstellen in pMC²X, ein Derivat des pMSCV*, kloniert. Der ORF des EYFP (enhanced yellow fluorescing protein) wurde dann aus pEYFP-N1 als “template“ PCR-amplifiziert (Tabelle 15) und nach Verdau mit BamHI und HindIII in dieselben Stellen von pMC²X+Profilin II-EGFP ligiert, so dass pMC²X+Profilin II-EYFP entstand.

| | | |
|-------------|-----------|---|
| ECFP | vorwärts | <u>CGGAATTC</u> ACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG |
| | rückwärts | TTCTGAAGCTTTTGAGCTCGAGATCTGAGTCCG |
| Profilin II | vorwärts | ACGCGGCCCGCCCTTCCATGGCCGGTTGGCAGAGCTACG |
| | rückwärts | CGCAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC |
| EYFP | vorwärts | CCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGC |
| | rückwärts | CGCGGAAGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC |

Tabelle 15: Oligonukleotide für die CFP und YFP Klonierung

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer für den kodierenden (vorwärts) und den komplementären Strang (rückwärts). Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Diese für Profilin II-YFP und CFP-VASP bzw. CFP-VASP ΔPRR kodierenden Plasmide wurden zusammen in MV^{D7} Zellen transferiert und im Durchflußzytometer Zellen aussortiert, die simultan Profilin und VASP Fusionsproteine exprimierten. In diesen Zellen rekrutierten motile Listerien gleichzeitig CFP-VASP wt und Profilin II-YFP (Abbildung 25e, e’). Motile Listerien, die CFP-VASP ΔPRR rekrutieren, können das Profilin II-YFP jedoch nicht anreichern (Abbildung 25f, f’). Dies zeigt, dass die Deletionen der Prolin-reichen Regionen die Profilin Rekrutierung verhindert.

* von Jim Bear (Massachusetts Institute of Technology (MIT), Boston MA, USA) zur Verfügung gestellt.

Trotz der großen Reduktion der Motilität nach Deletion der Prolin-reichen Regionen waren die Geschwindigkeiten der Listerien höher als in den parentalen MV^{D7} Zellen (Abbildung 25d). Wahrscheinlich besitzen VASP und Mena also weitere die Listerienmotilität fördernde Domänen (s.u.)

3.16 Die Listerienmotilität wird durch die Deletion der potentiellen G-Aktin-Bindungsdomäne von Mena reduziert

Ein konservierter basischer Bereich der EVH2-Domäne besitzt eine hohe Homologie zur Aktinmonomerbindungsstelle von Thymosin- β 4 (s. 1.3.3). Eine Bedeutung dieser Domäne für die Ena/VASP-Proteine wurde bisher nicht belegt, jedoch macht die starke Konservierung innerhalb der EVH2-Domäne eine funktionelle Bedeutung wahrscheinlich.

Die Deletion dieser potentiellen G-Aktinbindungsdomäne (Δ GAB) in Mena führt zu einer geringen aber signifikanten Reduktion der Listerienmotilität (Abbildung 26b). Ebenso zeigen die Schweife geringere Längen als die Listerienschweife in wt Mena exprimierenden Zellen (Abbildung 26a).

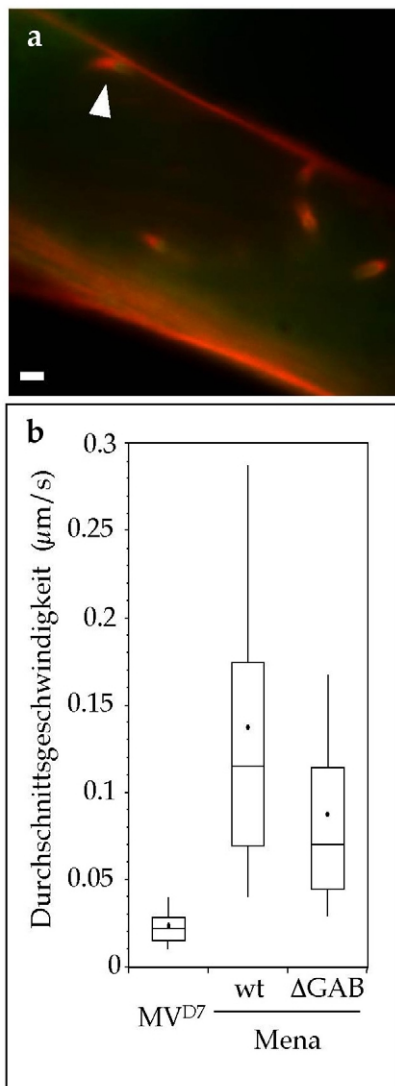


Abbildung 26: Die Deletion der potenziellen G-Aktinbindungsdomäne von Mena reduziert die Listerienmotilität

MV^{D7} Zellen, die GFP-Mena ΔGAB im hohen Level exprimierten, wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und das Aktinzytoskelet gefärbt. Die Listerien bildeten relativ kurze Schweife (a). Der Balken entspricht einer Länge von 1 μm. Die Geschwindigkeitsmessungen zeigten, dass die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der Listerien in GFP-Mena ΔGAB exprimierenden Zellen leicht reduziert gegenüber der wt Referenz waren (b).

3.17 Der Verlust der F-Aktinbindungsdomäne der Ena/VASP-Proteine steigert die Listerienmotilität

Die Interaktionen zwischen einer hoch konservierten F-Aktin-Bindungsdomäne innerhalb der VASP EVH2-Domäne und Aktinfilamenten wurde mehrfach *in vitro* belegt (s. 1.3.7).

Fluoreszenzaufnahmen von *Listeria monocytogenes* in den MV^{D7} GFP-Mena ΔFAB und MV^{D7} GFP-VASP ΔFAB Zellen zeigten lange Schweife, die den Schweifen der Listerien in den mit wt Ena/VASP-rekonstituierten Zellen ähnelten (Abbildung 27a,

b). Dies lässt vorerst nicht auf eine essentielle Funktion dieser Domäne in der Listerienmotilität schließen.

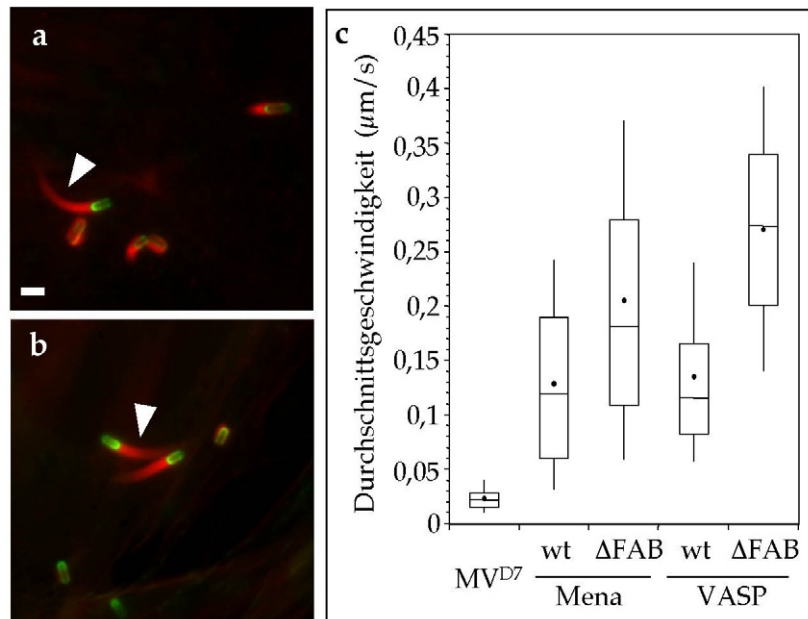


Abbildung 27: Die Deletion der F-Aktinbindungsdomäne steigert die Listerienmotilität

MV^{D7} Zellen, die GFP-Mena Δ FAB oder GFP-VASP Δ FAB im hohen Level exprimierten, wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und das Aktinzytoskelet gefärbt. In MV^{D7} GFP-Mena Δ FAB (a) und MV^{D7} GFP-VASP Δ FAB (b) bildeten die Listerien lange Schweife. Der Balken entspricht einer Länge von 1 μ m. Die Geschwindigkeitsmessungen zeigten, dass die Listerienmotilität in GFP-Mena Δ FAB und vor allem in GFP-VASP Δ FAB exprimierenden Zellen deutlich gesteigert war (c).

Die Geschwindigkeitsmessungen zeigten dann, dass die Listerienmotilität in den MV^{D7} GFP-Mena Δ FAB und den MV^{D7} GFP-VASP Δ FAB Populationen im Vergleich zur wt Referenz deutlich erhöht waren. Vor allem in den GFP-VASP Δ FAB Zellen war die Listerienmotilität extrem gesteigert (Abbildung 27c).

Die Deletion der F-Aktinbindungsdomäne in VASP oder Mena führt also zu einer wesentlich erhöhten Listerienmotilität.

3.18 Die Multimerisierungs-Domäne der Ena/VASP-Proteine ist für die Listerienmotilität nicht essentiell

Der äußerste carboxyterminale Teil der EVH2-Domäne ist *in vitro* für die Formation von VASP-Tetrameren verantwortlich. Dies geschieht wahrscheinlich durch Ausbildung von “coiled coil“-Strukturen (s. 1.3.7). Als Multimer könnten Ena/VASP-Proteine viel effizienter Profilin und andere Faktoren rekrutieren und so die Aktinpolymerisation stärker fördern. Das Unterbinden der Multimerisierung sollte also die Listerienmotilität negativ beeinflussen.

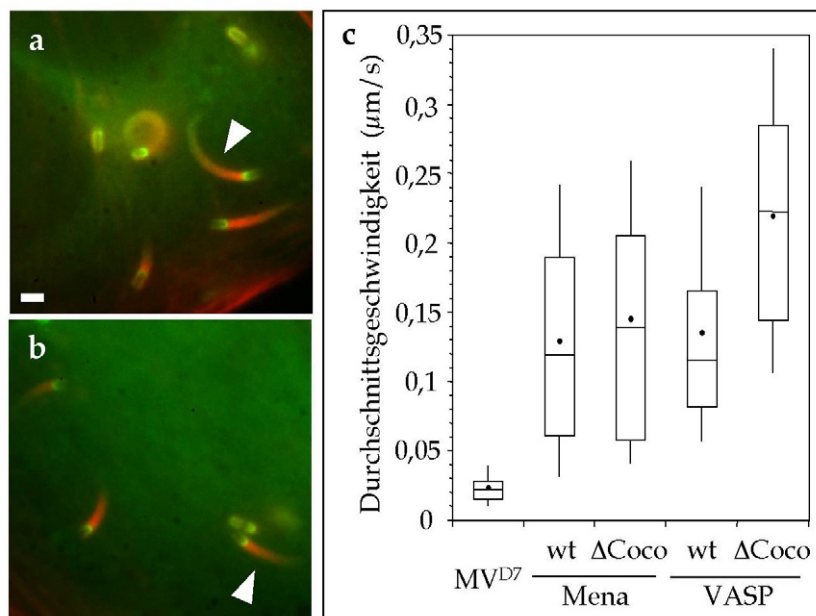


Abbildung 28: Die Multimerisierungsdomäne ist für die Listerienmotilität nicht essentiell

MV^{D7} Zellen, die GFP-Mena ΔCoco oder GFP-VASP ΔCoco im hohen Level exprimierten, wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und das Aktinzytoskelet gefärbt. In MV^{D7} GFP-Mena ΔCoco (a) und MV^{D7} GFP-VASP ΔCoco (b) bildeten die Listerien lange Schweife. Der Balken entspricht einer Länge von 1 μm. Die Geschwindigkeitsmessungen zeigten, dass sich die Listerienmotilität in GFP-Mena ΔCoco Zellen nicht signifikant von der wt Referenz unterschied, jedoch in GFP-VASP ΔCoco exprimierenden Zellen erhöht war (c).

Nach Deletion dieser Region in VASP und Mena bildeten die wt Listerien jedoch Schweife, die morphologisch nicht von denen in Mena oder VASP wt exprimierenden MV^{D7} Zellen zu unterscheiden waren (Abbildung 28a und b). Auch die gemessenen Geschwindigkeiten der Listerien in MV^{D7} GFP-Mena ΔCoco Zellen entsprachen

denen in MV^{D7} GFP-Mena wt Zellen. In MV^{D7} GFP-VASP Δ Coco Zellen bewegten sie sich sogar signifikant schneller als in den wt VASP Referenzzellen (Abbildung 28c).

Dieses unerwartete Ergebnis zeigt, dass die Multimerisierungs-Domäne für die Listerienmotilität nicht essentiell ist. Im Fall von VASP fördert die Deletion dieser Domäne sogar die Listerienmotilität.

3.19 Die Phosphorylierung der Ena/VASP-Proteine erhöht die Listerienmotilität

Der Phosphorylierungsgrad von Ena/VASP-Proteinen beeinflusst *in vitro* die Bindung zu F-Aktin und zu SH3-Domänen (s. 1.3.7). Durch Verwendung von Mutanten, die den phosphorylierten Status durch eine Substitution der phosphorylierbaren Aminosäuren zu negativ geladenen Asparaginsäuren und den dephosphorylierten Status durch eine Substitution mit ungeladenen Alaninen simulieren, sollte der Effekt der Ena/VASP-Phosphorylierung auf die Listerienmotilität untersucht werden.

Durch fluoreszenzmikroskopische Betrachtung ließen sich bei allen sechs VASP und vier Mena Phospho- bzw. Dephosphomutanten im Vergleich zum wt keine Unterschiede in der Schweifmorphologie erkennen (nur für die kompletten Mutanten in Abbildung 29a-d gezeigt). Die Geschwindigkeitsmessungen zeigten jedoch signifikante Unterschiede in der Listerienmotilität in MV^{D7} Zellen mit simulierten phosphorylierten oder dephosphorylierten Ena/VASP-Proteinen. Allgemein war zu erkennen, dass sich die Listerien in den MV^{D7} Zellen mit den Phosphomutanten schneller bewegten als in denen mit den Dephosphomutanten (Abbildung 29e). Die Phosphorylierung von VASP und Mena steigert also die Listerienmotilität. Dieser Effekt war bei den kompletten Mutanten besonders ausgeprägt (s. auch Tabelle 16).

Auffällig war, dass die Listerienmotilität in MV^{D7} GFP-VASP AAA Zellen im Gegensatz zu MV^{D7} GFP-Mena AA Zellen nicht geringer als in der wt Referenz war (Tabelle 16). Alle VASP Phospho- und Dephosphomutanten unterschieden sich signifikant voneinander. Die kompletten Mena Phospho- und Dephosphomutanten

unterschieden sich ebenso voneinander, während die Mena Mutanten des aminoterminalen Serins nicht signifikant unterschiedlich waren (Tabelle 16).

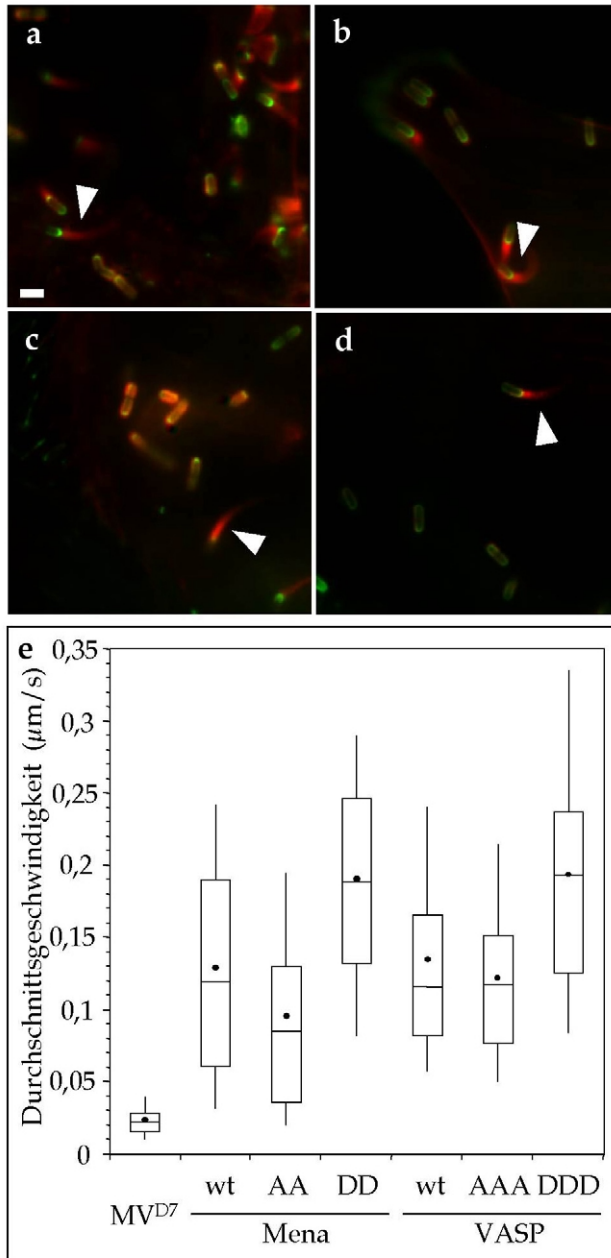


Abbildung 29: Die Phosphorylierung der Ena/VASP-Proteine steigert die Listerienmotilität.

MV^{D7} Zellen, die GFP-Mena AA (a), GFP-Mena DD (b), GFP-VASP AAA (c) oder GFP-VASP DDD (d) im hohen Level exprimierten, wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD wt infiziert, fünf Stunden nach der Infektion fixiert und das Aktinzytoskelett gefärbt. Die Listerien besitzen morphologisch normale lange Schweife. Der Balken entspricht einer Länge von 1 µm. Die Geschwindigkeitsmessungen zeigten (e), dass die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der Listerien in MV^{D7} GFP-Mena AA Zellen sanken, in MV^{D7} GFP-Mena DD und GFP-VASP AAA der jeweiligen wt Referenz entsprachen und in MV^{D7} GFP-VASP DDD erhöht waren. So waren also die Listerien in Zellen, die die Phosphomutanten exprimierten, motiler als in Zellen, die die Dephosphomutanten exprimierten.

3.20 Zusammenfassung der Motilitätsexperimente in Ena/VASP-rekonstituierten MV^{D7} Zellen

Die geschilderten Experimente zeigten, dass vor allem der Verlust der Prolin-reichen Regionen und, im geringeren Maß der G-Aktinbindungsdomäne, die Listerienmotilität

hemmt. Dagegen führte die Deletion der VASP “coiled coil“-Domäne, aber vor allem der F-Aktinbindungsdomäne von VASP, zu einer extremen und bei Mena zu einer geringeren Steigerung der Listerienmotilität. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst und deren Signifikanz laut Mann-Whitney-U-Test dargestellt (s. 2.10.2).

| | Vergleich zwischen | | signifikanter Unterschied | p |
|-------------|--------------------|---------------|---------------------------|-------------|
| | A | B | | |
| | VASP wt | Mena wt | | 0,44 |
| VASP | wt | ΔGP_5 | - | 0,00 |
| | | ΔPRR | - | 0,00 |
| | | ΔFAB | + | 0,00 |
| | | $\Delta Coco$ | + | 0,00 |
| | | DST | + | 0,04 |
| | | DDT | + | 0,00 |
| | | DDD | + | 0,00 |
| | | AST | - | 0,04 |
| | | AAT | | 0,56 |
| | | AAA | | 0,48 |
| | AST | DST | + | 0,00 |
| | AAT | DDT | + | 0,01 |
| | AAA | DDD | + | 0,00 |
| | AST | AAT | | 0,22 |
| | AAT | AAA | | 0,88 |
| | AST | AAA | | 0,24 |
| | DST | DDT | | 0,34 |
| | DDT | DDD | | 0,42 |
| | DST | DDD | | 0,06 |
| Mena | wt | ΔPRR | - | 0,00 |
| | | ΔGAB | - | 0,00 |
| | | ΔFAB | + | 0,00 |
| | | $\Delta Coco$ | | 0,24 |
| | | DS | | 0,08 |
| | | DD | + | 0,00 |
| | | AS | - | 0,00 |
| | | AA | - | 0,01 |
| | AS | DS | | 0,40 |
| | AA | DD | + | 0,00 |
| | DS | DD | + | 0,00 |
| | AS | AA | | 0,58 |

Tabelle 16: Zusammenfassung der Motilitätsexperimente in Ena/VASP-rekonstituierten MV^{D7} Zellen

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests. Ist die Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$, so besteht mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit ein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen. +: die Listerienmotilität ist in Gruppe B höher; -: die Listerienmotilität ist in Gruppe B geringer; keine Angabe: kein signifikanter Unterschied.

4 DISKUSSION

4.1 Profilin-GFP funktioniert als fluoreszierender Marker

In dieser Arbeit wurde das GFP als fluoreszierender Marker an humanes Profilin IIb fusioniert und dadurch die Analyse der Profilindynamik in lebenden Zellen ermöglicht. Der Erfolg dieser Strategie war zu Beginn fraglich, da das GFP wesentlich größer als Profilin ist und sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus von Profilin offensichtlich direkt in die Ligandenbindungsdomänen dieses sehr kompakt gebauten Moleküls integriert schienen. Dies alles ließ eine Maskierung der Profilinbindungsdomänen durch das GFP, eine sterische Behinderung der Ligandenbindung oder eine Zerstörung der originalen Profilintertiärstruktur befürchten.

Eines der vier verschiedenen getesteten Fusionsproteine lokalisierte aber spezifisch an intrazellulären Listerien. Dieses Profilin II-GFP zeichnet sich durch einen langen, flexiblen und hydrophilen Linker zwischen der GFP- und der Profilindomäne aus, wodurch wahrscheinlich sterische Hinderungen oder Veränderungen der dreidimensionalen Proteinstruktur minimiert werden. Die getesteten Profilin I-GFP und GFP-Profilin I und II Konstrukte lokalisierten trotz vergleichbarer Eigenschaften der “linker“ nicht in der beschriebenen Weise. Möglicherweise ist eine Fusion am Aminoterminal des Profilin in Kombination mit diesem Linker aus sterischen Gründen nicht geeignet. Außerdem könnte die leicht unterschiedliche Tertiärstruktur des Profilin II im Vergleich zu Profilin I (Lambrechts *et al.*, 1997) in diesem Kontext besser geeignet sein.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jockusch* wurde gezeigt, dass sich die *in vitro* Ligandenbindungseigenschaften des Profilin II-GFP zu

* Prof. Dr. B. M. Jockusch, Abteilung für Zoologie, Technische Universität Braunschweig

Aktinmonomeren, VASP und PIP₂ nicht von denen des unmarkierten Profilins unterschieden. Die erwartungsgemäße Lokalisation und die unveränderte *in vitro* Ligandenbindung erlaubten es, das Profilin II-GFP zur Analyse der Profilindynamik in lebenden Zellen einzusetzen.

Dabei musste beachtet werden, dass die übermäßige Expression von Profilin II, das zudem in den verwendeten Epithel- und Fibroblastenzellen nicht vorkommt (Witke *et al.*, 1998, Giesemann *et al.*, 1999), artifizielle Auswirkungen auf die Mikrofilamentdynamik haben könnte. Aus diesem Grund wurden nur schwach exprimierende Zellen analysiert, in denen die Profilin Lokalisation gerade ausreichend zu erkennen war. Stärker transfizierte Zellen wurden nicht verwendet, da allein schon der übermäßig große zytoplasmatische Hintergrund die Erkennung einer spezifischen Profilinlokalisierung erschwert hätte. Weiterhin wiesen alle untersuchten Zellen eine mit den parentalen Zellen vergleichbare Morphologie auf, das Profilin lokalisierte spezifisch und die durchschnittliche Listeriengeschwindigkeit in Profilin II-GFP exprimierenden Zellen unterschied sich nicht signifikant von der in parentalen Zellen. Dies impliziert, dass die exogene Expression des Profilin II-GFP unter diesen Voraussetzungen offensichtlich keine artifiziellen Effekte hervorrief.

4.2 Profilin interagiert mit Ena/VASP-Proteinen während der Listerienmotilität

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Profilin in Abhängigkeit von der Listeriengeschwindigkeit durch Ena/VASP-Proteine zur Polymerisationszone dieser Bakterien rekrutiert wird.

Frühere Studien sind in Einklang mit diesem Ergebnis. Die Listerienmotilität verhält sich proportional zur Aktinpolymerisation, die von Profilin *in vitro* stimuliert wird (Theriot *et al.*, 1992, Pantaloni and Carlier, 1993). Auch die Abhängigkeit der Profilinwirkung von den Ena/VASP-Proteinen wird durch frühere Studien belegt. Profilin dimerisiert *in vitro* an Ena/VASP-Proteinen (Lambrechts *et al.*, 2000 b, Mahoney *et al.*, 1997), was die Dissoziation der sequestrierten Aktinmonomere erleichtert (Jonkheere *et al.*, 1999). Profilin fördert nur zusammen mit Ena/VASP-Proteinen die Listerienmotilität in Zellextrakten (Theriot *et al.*, 1994, Smith *et al.*,

1996, Loisel *et al.*, 1999). Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Injektion von Prolin-reichen Peptiden, die mit Profilinliganden um die Profilinbindung kompetitieren können, mit der Shigellen- und Listerienmotilität interferiert (Zeile *et al.*, 1996, Kang *et al.*, 1997). Schließlich zeigten genetische Studien, dass Profilin zusammen mit Ena/VASP-Proteinen an Neurulationsprozessen beteiligt ist (Lanier *et al.*, 1999).

Profilin kolokalisierte nicht nur in der Polymerisationszone motiler Listerien und in “focal adhesions“ mit VASP bzw. Mena, sondern lokalisierte auch in der Front sich ausbreitender Lamellipodien. Die Verteilung und Dynamik von Profilin in sich ausbreitenden Lamellipodien gleicht im Detail der von GFP-VASP in der gleichen Zelllinie (Rottner *et al.*, 1999).

Diese Erkenntnisse stützen somit die Hypothese, dass Profilin-Ena/VASP-Interaktionen *in vivo* Aktin-vermittelte Motilität beeinflussen. Profilin kann G-Aktin sequestrieren sowie den Nukleotidaustausch fördern und dadurch einen Pool polymerisationsfähiger Aktinmonomere bereithalten. Die Ena/VASP-Proteine rekrutieren dann Profilin:Aktin zu aktiven Polymerisationszonen, wo die komplexierten Aktinmonomere dissoziieren und an die “barbed ends“ polymerisieren. Profilin könnte bei der Bindung an die prolinreichen Regionen von Ena/VASP-Proteinen dimerisieren und dadurch besonders effizient Aktinmonomere rekrutieren und abgeben. So könnten interagierende Ena/VASP-Proteine und Profilin lokal begrenzt die Aktinfilamentelongation fördern.

4.3 Die Profilin-Ena/VASP-Interaktion könnte reguliert sein

Die durchgeführten Experimente konnten nicht klären, ob die mit der Listerienmotilität korrelierende Profilinrekrutierung die Ursache oder die Folge einer veränderlichen Aktinpolymerisation ist. Eine Regulation der Profilin-Ena/VASP-Interaktion wäre durch Phospho- und Dephosphorylierung der Ena/VASP-Proteine möglich. Sie könnten entweder die Affinität der Prolin-reichen Regionen zu Profilin beeinflussen oder die Kinetik der Komplexassoziation und -dissoziation modifizieren. Tatsächlich werden Ena/VASP-Proteine *in vivo* phosphoryliert, was mit

Auswirkungen auf die Thrombozytenaggregation korreliert (Nolte *et al.*, 1991, Horstrup *et al.*, 1994, Aszodi *et al.* 1999). Verschiedene *in vitro* Experimente scheinen diese These jedoch nicht zu stützen. So konnte sowohl phosphoryliertes als auch dephosphoryliertes VASP mit Profilin gekoppelten “beads“ sedimentiert werden (Reinhard *et al.*, 1995). In Koimmunpräzipitationsexperimenten nach *in situ* “crosslinking“ und in Hefe-“two-hybrid“-Experimenten konnte ebenfalls kein Unterschied in der Profilinbindung zwischen wt VASP und VASP Phosphomutanten nachgewiesen werden. Aktinpolymerisationsexperimente mit VASP, Profilin und Aktin zeigten, dass phosphoryliertes VASP genau wie dephosphoryliertes an Profilin bindet (Harbeck *et al.*, 2000). Diese Experimente erscheinen jedoch nicht geeignet, Unterschiede der Profilin-Ena/VASP-Interaktion quantitativ zu analysieren. In Oberflächen-Plasmonresonanz-Experimenten konnte ebenfalls kein Unterschied in der Bindungskinetik von phosphorylierten und nicht phosphorylierten VASP zu Profilin nachgewiesen werden (Harbeck *et al.*, 2000). Diese Experimente berücksichtigten jedoch nicht den Einfluss der rekrutierten Aktinmonomere oder der freien “barbed ends” auf die Assoziations- und Dissoziationskinetik. Diese *in vitro* Studien sind somit nur bedingt geeignet, Aussagen über die Interaktionen von Aktinmonomeren, Profilin, Ena/VASP-Proteinen und Filament “barbed ends” *in vivo* abzuleiten. In weitergehenden *in vivo* Studien sollten deshalb die Ena/VASP-Proteine in Hinblick auf die Funktion ihrer Domänen und der Phosphorylierung in der Listerienmotilität untersucht werden.

4.4 Ena/VASP-freie Zellen ermöglichen die *in vivo*-Analyse der Ena/VASP-Proteine

Die entscheidende Voraussetzung für eine funktionelle *in vivo* Analyse der Ena/VASP-Proteine war ein zellulärer Hintergrund, der frei von allen endogenen Ena/VASP-Proteinen ist. Endogene Ena/VASP-Proteine hätten eine Quantifizierung der Auswirkungen mutierter Varianten unmöglich gemacht, da sie mit den exogenen Ena/VASP-Proteinen kompetitiert hätten. Die verwendeten MV^{D7} Zellen boten diesen Ena/VASP-Protein freien Hintergrund (Bear *et al.*, 2000). Sie ließen sich zudem

infizieren und gewährten den Listerien in einem flach ausgebreiteten Zytoplasma ausreichenden Bewegungsraum.

Der retrovirale Gentransfer erzeugte stabil transfizierte MV^{D7} Zellen, deren Expressionsrate des Transgens durch die GFP-Fluoreszenz direkt messbar war. So konnten Populationen mit eng begrenzter Expressionsrate im Durchflußzytometer aussortiert, und die Auswirkungen der Ena/VASP-Mutanten in der Listerienmotilität quantitativ analysiert werden. Es erschien nicht ratsam, klonale Zelllinien zu erzeugen, da die retroviral in die Zellen transferierten Gene an einem nicht vorherbestimmten Ort ins Zellgenom integriert wurden. Je nach Insertionsort könnten Veränderungen im Genom entstehen, die artifizielle Effekte in einen Vergleich zweier klonaler Zelllinien einfließen lassen würden. In einer Zellpopulation hingegen gehen wenige durch die retrovirale Integration des Transgens veränderte Zellen statistisch in der Gesamtpopulation unter. Die exprimierte Ena/VASP-Menge veränderte sich während der Untersuchungszeit nicht signifikant, wie die abschließende Kontrolle der Populationen im Durchflußzytometer belegte.

Die in den MV^{D7} Zellen exprimierten wt GFP-VASP und wt GFP-Mena Fusionsproteine lokalisierten erwartungsgemäß an der Front sich ausdehnender Lamellipodien, an der Spitze von Filopodien, in “focal adhesions”, punktiert auf Stressfasern und an der Zellwand der Listerien. Diese Lokalisation stimmt exakt mit der von unmarkierten VASP oder Mena überein (Reinhard *et al.*, 1992, Gertler *et al.*, 1996, Lanier *et al.*, 1999). Die Ligandenbindung der Ena/VASP-Proteine wurde also nicht durch die GFP-Markierung am Aminoterminus der EVH1-Domäne verändert.

Keine der Mutanten zeigte im Immunoblot Abbauprodukte, die auf eine veränderte Stabilität durch die Mutagenese hindeuten würden. Sie lokalisierten alle an der Listerienzellwand, während die zelluläre Lokalisation nur durch die GAB- und die Coco-Deletionen verändert wurde. Auch diese Konstrukte waren aber noch in “focal adhesions” und an Stressfasern zu finden, lokalisierten also nicht völlig unspezifisch. Diese veränderte Lokalisation deckt sich mit der einer kompletten EVH2-Domänen

Deletion (persönliche Mitteilung von Dr. Klemens Rottner^{*}), weist also eher auf eine Interaktion der EVH2-Domäne mit Liganden in Lamellipodien und Filopodien hin. Übereinstimmend lokalisiert die EVH2-Domäne in Lamellipodien (Nakagawa *et al.*, 2001). Schließlich waren alle Mutanten in der Listerienmotilität funktional und steigerten die Listeriengeschwindigkeit immer über das Maß in den parental MV^{D7} Zellen. Eine durch die Mutagenese verursachte ausgedehnte Zerstörung der Ena/VASP Proteinstruktur erscheint daher unwahrscheinlich.

4.5 Ena/VASP-Proteine fördern *in vivo* die Aktinpolymerisation durch Profilin Rekrutierung

Ohne Ena/VASP-Proteine bildeten die Listerien nur kurze Schweife aus und bewegten sich mit sehr geringen Geschwindigkeiten durch das Zytoplasma. Die Expression von wt Mena oder wt VASP führte in den MV^{D7} Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Listerienmotilität. Dieser Effekt korrelierte mit der exprimierten Ena/VASP-Menge. Dies belegt die essentielle Bedeutung der Ena/VASP-Proteine für eine effiziente Listerienmotilität und stimmt mit früheren Untersuchungen überein (Pistor *et al.*, 1995, Smith *et al.*, 1996, Niebuhr *et al.*, 1997, Laurent *et al.*, 1999, Loisel *et al.* 1999). Die Motilität der Δ ActA5 Listerienmutante in mit wt Mena rekonstituierten MV^{D7} Zellen war etwas größer als die der wt Listerien in den parental MV^{D7} Zellen. Diese leichte Steigerung der Listerienmotilität könnte durch die unspezifisch im Schweif angereicherten Ena/VASP-Proteine hervorgerufen werden, die wahrscheinlich auch so die Motilität im geringen Maße fördern können.

Die Deletion der Prolin-reichen Regionen führte wie vermutet zu einer deutlichen Reduktion der Listerienmotilität und verhinderten die Profilinrekrutierung. Dies zeigt, dass die Rekrutierung von Profilin durch die Prolin-reichen Regionen essentiell für die effiziente Listerienmotilität ist. Obwohl allein ein (GP₅)₃-Peptid effektiv mit

^{*} Dr. Klemens Rottner, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig

VASP um Profilinliganden kompetitieren konnte (Kang *et al.*, 1997), behinderte die entsprechende GP₅-Deletion die Listerienmotilität im Vergleich zur kompletten Deletion aller Prolin-reichen Regionen nur sehr schwach. Dies belegt, dass auch die kurzen Prolin-reichen Regionen *in vivo* relevant sind.

Der drastische Effekt der kompletten Deletion aller Prolin-reichen Regionen steht einer nur geringen Motilitätsreduktion von Listerien in Zellextrakten gegenüber, die nach einer Profilindepletion erzielt werden konnte. Außerdem konnte nach gleichzeitiger Depletion von VASP und Profilin die ursprüngliche Motilität schon durch VASP-Zugabe annähernd rekonstituiert werden (Laurent *et al.*, 1999). In einer ähnlichen Studie konnte die Listerienmotilität durch 99-prozentige Profilindepletion nicht beeinträchtigt werden (Marchand *et al.*, 1995). Es ist in diesen Experimenten jedoch nicht auszuschließen, dass die Profilindepletionen unvollständig waren und allein die Restmengen für die Listerienmotilität ausreichten. Auch wird die Verfügbarkeit von polymerisationsfähigen Aktinmonomeren nicht wie in einer intakten Zelle strikt reguliert, so dass dies in Zellextrakten möglicherweise kein stark limitierender Faktor ist.

Auffällig war, dass die Listeriengeschwindigkeit nach Deletion der Prolin-reichen Regionen in VASP und Mena trotz der großen Reduktion immer noch signifikant größer als in den parental MV^{D7} Zellen war. Dies deutet auf eine weitere Funktion der Ena/VASP-Proteine in der Listerienmotilität hin, die auch ohne die Prolin-reichen Regionen stimulierend auf die Aktinpolymerisation wirkt. Möglicherweise beeinflusst diese Funktion die Organisation der Aktinfilamente im Schweif, durch die Aktinfilamentbindung oder eine Aktinmonomerbindung stimuliert, im geringen Maß die Aktinpolymerisation.

Die *in vitro* belegte Interaktion von Ena/VASP-Proteinen mit Aktinfilamenten durch die FAB-Domäne (Bachmann *et al.*, 1999, Hüttelmaier *et al.*, 1999) könnte sicherlich eine derartige organisatorische Aufgabe übernehmen, indem sie die “barbed ends” senkrecht zur Bakterienzellwand ausrichtet. So würde der Druck der sich verlängernden Aktinfilamente effizienter in Vortrieb umgesetzt werden.

Die Aktinmonomerbindung könnte durch die potenzielle G-Aktin-Bindungsdomäne vermittelt werden. Sie weist eine Basenzusammensetzung mit Homologie zur G-Aktinbindungsdomäne von Thymosin-β4 auf (Van Troys *et al.*, 1996). Diese Tatsache

und die Konservierung innerhalb der EVH2-Domäne machen eine Funktion dieser Domäne *in vivo* wahrscheinlich, und die zwar geringe aber dennoch signifikante Reduktion der Listerienmotilität nach Deletion dieser Region in Mena bestätigt dies. Dennoch ist die Aktinmonomerbindung dieses Motivs in Ena/VASP-Proteinen bisher nicht belegt und weitergehende Schlussfolgerungen auf dieser Basis nur hypothetisch. *In vitro* wurde gezeigt, dass VASP eine Aktinfilamentnukleation ermöglicht (Hüttelmayer *et al.*, 1999, Harbeck *et al.*, 2000), und im “bead assay“ und “mitochondria targeting assay“ wurde kürzlich demonstriert, dass VASP mit ActA aber Arp2/3 unabhängig zur Aktinnukleation beiträgt (Fradelizi *et al.*, 2001). Die Bedeutung dieses Effekts für die Listerienmotilität ist jedoch fraglich, da eine Nukleation durch eine Mutation im Aminoterminus von ActA völlig verhindert wurde, obwohl weiterhin Ena/VASP-Proteine an die Listerienzellwand lokalisierten (Pistor *et al.*, 2000). Alternativ könnte diese Domäne selbst Aktinmonomere rekrutieren oder die Dissoziation des Aktins aus dem VASP:Profilin:Aktin-Komplex durch die Interaktion mit dem vom Profilin rekrutierten G-Aktin katalysieren und dadurch die Mikrofilamentelongation fördern.

4.6 F-Aktinbindung und Multimerisierung der Ena/VASP-Proteine behindern die Listerienmotilität

Die Interaktion von VASP und Aktinfilamenten wurde *in vitro* belegt und auf die deletierte F-Aktinbindungsdomäne eingegrenzt (Bachmann *et al.*, 1999, Hüttelmaier *et al.*, 1999). Die entsprechende Deletion führte in dieser Arbeit zu einer deutlichen Steigerung der Listerienmotilität. Diese Domäne ist also nicht essentiell, sondern behindert die Listerienmotilität.

Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass die F-Aktinbindung der Ena/VASP-Proteine den Aktinschweif am Bakterium fixiert aber gleichzeitig die Insertion neuer Aktinmonomere erlaubt. Ena/VASP-Proteine würden so als Verbindung zwischen ActA und dem “barbed end” eines Aktinfilaments fungieren und bei einer Filamentelongation dem wachsenden Ende folgen. Es wäre denkbar, dass das “barbed end” anhand der ATP-Aktin-Kappe vom Rest des Filaments unterschieden werden

kann. Biophysikalische Experimente konnten übereinstimmend zeigen, dass eine ständige physikalische Verbindung zwischen einigen Aktinfilamenten des Schweifs und den Listerien besteht (Kuo and McGrath, 2000). Diese Schlussfolgerungen stehen im Widerspruch zum sog. “Brownian-ratched-model“, in dem der Schweif mit dem Listerium nicht verbunden ist und die Elastizität der Filamente die Interkalation von Monomeren erlauben (Mogilner and Oster, 1993). Das vorgeschlagene sog. “Molecular-Ratched-Model“ (Laurent *et al.*, 1999), in dem das Wachstum des Filaments einen Druck zwischen Schweif und Listerium aufbaut, der durch zyklisches Lösen und Wiederaufbau der Ena/VASP-Filament-Verbindung ausgeglichen wird, wobei sich das Bakterium vorwärts bewegt, entspricht eher diesen Ergebnissen. Allerdings wird in dieser Studie geschlossen, dass eine Interaktion von VASP und Aktinfilamenten essentiell für die Listerienmotilität ist. Dies wurde in dieser Arbeit jedoch widerlegt.

In vitro wurde gezeigt, dass VASP bevorzugt Tetramere bildet und auch Ena multimerisieren kann. Diese Funktion konnte auf die deletierte “coiled coil“-Region eingegrenzt werden (Ahern-Djamali *et al.*, 1998, Bachmann *et al.*, 1999). Durch eine Multimerisierung der Ena/VASP-Proteine an der Listerienoberfläche könnte theoretisch eine wesentlich größere Profilin-Aktin Menge rekrutiert und dadurch die Aktinpolymerisation stärker stimuliert werden. Die Coco-Deletionen in VASP förderte jedoch die Listerienmotilität. Auch in Mena ist diese Domäne nicht essentiell für eine effiziente Listerienmotilität. Möglicherweise ist es entweder aus sterischen Gründen für ein Ena/VASP-Multimer unmöglich, mehr Profilin:Aktin zu rekrutieren als ein Monomer, oder zusätzlich rekrutiertes Profilin:Aktin kann aufgrund der limitierenden Anzahl freier “barbed ends” nicht zu einer zusätzlichen Polymerisation an der Listerienoberfläche beitragen.

Ein VASP-Multimer scheint eher die behindernde Funktion der Aktinfilamentbindung zu potenzieren. Eine Verhinderung der Multimerisierung führt somit möglicherweise zu einer Abschwächung des negativen Effekts der Aktinfilamentbindung, so dass sich die Listerienmotilität erhöht. Eine derartige synergistische Verstärkung der Filamentbindung durch die VASP-Tetramerisierung wurde *in vitro* bestätigt (Bachmann *et al.*, 1999). Da der Effekt der Coco-Deletion nur bei VASP ausgeprägt war, könnte dies bedeuten, dass nur VASP aber nicht Mena auf der

Listerienoberfläche Multimere bildet. Dies würde wiederum den weniger stark ausgeprägten Effekt der FAB-Deletion in Mena erklären, da in diesem Fall die behindernde Funktion der Aktinfilamentbindung natürlicherweise geringer wäre. Da die F-Aktin-Bindungsdomänen von VASP und Mena fast identisch aufgebaut und auch innerhalb des Proteins an gleicher Position angeordnet sind, erscheint eine unterschiedliche Affinität dieser Domänen, die auch für die unterschiedliche Stärke des FAB-Deletionseffekts verantwortlich sein könnte, eher unwahrscheinlich.

4.7 Die Ena/VASP-Phosphorylierung fördert die Aktinpolymerisation

Die hier durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die simulierte Phosphorylierung von VASP und Mena die Listerienmotilität fördert. Änderungen im Phosphorylierungsstatus von Ena/VASP-Proteinen könnten Auswirkungen auf alle beschriebenen Funktionen haben.

So ist erstens denkbar, dass eine Phosphorylierung die Interaktion der Ena/VASP-Proteine mit Profilin:Aktin-Komplexen verändert. Eine verstärkte Affinität, eine beschleunigte Assoziation oder Dissoziation oder die Favorisierung der Rekrutierung von Profilindimeren könnte die Aktinpolymerisation fördern. Indirekt könnte die Phosphorylierung die Ena/VASP:Profilin:Aktin-Wechselwirkungen über die G-Aktin-Interaktion modulieren. *In vitro* Experimente konnten diese Annahmen bisher jedoch nicht stützen (s. 4.3).

Zweitens könnte die Phosphorylierung die Bindung zu Aktinfilamenten schwächen und wirkt so wie die Deletion der F-Aktin-Bindungsdomäne stimulierend auf die Listerienmotilität. *In vitro* Experimente demonstrierten, dass die Aktinfilament:VASP Interaktion salzsensitiv ist, was eine elektrostatische Wechselwirkung impliziert, die durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppen leicht gestört werden könnte (Hüttelmaier *et al.*, 1999). Tatsächlich konnte der inhibierende Effekt der Phosphorylierung von VASP auf die Aktinfilamentbindung von Harbeck *et al.* (2000) *in vitro* belegt werden. In einer älteren Studie zeigten Kosedimentationsexperimente von VASP mit F-Aktin allerdings, dass heterogen phosphoryliertes VASP mit höherer

Affinität an Aktinfilamente bindet als nicht phosphoryliertes VASP (Laurent *et al.*, 1999).

Schließlich könnte die Phosphorylierung die VASP-Multimerisierung an der Listerienoberfläche behindern und damit den Effekt der inhibierenden Aktinfilamentbindung verringern. Wie für die Profilin-VASP-Interaktion, konnten im Hefe “crosslinking“-Experiment und mit Immunpräzipitationen nach *in situ* “crosslinking“ kein signifikanter Unterschied zwischen phosphorylierten und dephosphorylierten VASP in der Multimerisierung belegt werden (Harbeck *et al.*, 2000), was aber auch in diesem Fall nicht völlig ausschließt, dass ein derartiger Effekt *in vivo* existent ist.

Insgesamt erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die Hyperphosphorylierung *in vivo* eine Schwächung der Aktinfilamentbindung hervorruft und dadurch die Listerienmotilität fördert. Ein Einfluss der Phosphorylierung auf die Interaktion mit Profilin, G-Aktin und auf die Multimerisierung muss jedoch weiterhin in Betracht gezogen werden. Außerdem muss bedacht werden, dass die Simulation der Phosphorylierung durch Einbau von Aminosäuren mit negativer Ladung nicht exakt einem hyperphosphorylierten VASP entspricht. *In vitro* verhielten sich derartige Mutanten zwar tendenziell wie phosphoryliertes VASP, quantitativ waren die ausgelösten Effekte jedoch deutlich geringer (Harbeck *et al.*, 2000).

4.8 Aktin-vermittelte Listerienmotilität und zelluläre Mikrofilamentdynamik

Eine Zusammenfassung dieser Schlussfolgerungen mit den Ergebnissen früherer Studien ergibt das folgende hypothetische Modell der Ena/VASP-Funktionen während der Aktinfilamentelongation an motilen Listerien (Abbildung 30). ActA hat zwei verschiedene Funktionen: Es induziert die Nukleation eines Aktinfilaments (a) und fördert die Filamentelongation durch die Rekrutierung von Ena/VASP-Proteinen (b). Zumindest VASP bildet dabei wahrscheinlich ein Multimer. Für ein VASP Tetramer würden im ActA vier FP₄-Motive für die EVH1-Bindung zur Verfügung stehen. Alternativ könnten sogar vier Tetramere pro ActA-Molekül rekrutiert werden. Die Ena/VASP-Proteine fördern die Filamentorganisation durch die Rekrutierung von

Profilin:Aktin-Komplexen, wahrscheinlich in Form von Profilindimeren (c). Die GAB-Domäne könnte die Dissoziation des rekrutierten Aktins katalysieren (d) oder im geringen Maß direkt zur Rekrutierung von Aktin beitragen. Die durch das Profilin rekrutierten Aktinmonomere dissoziieren aus dem Ena/VASP:Profilin:Aktin-Komplex und polymerisieren am “barbed end” (e). Die Anzahl ungeschützter “barbed ends”, kinetische Aspekte oder sterische Hinderung limitiert dabei einen potentiell verstärkenden Effekt der Ena/VASP-Multimerisierung auf die Profilin Rekrutierung. Die FAB-Domäne verbindet während der Elongation ständig das wachsende Filamentende via ActA mit den Listerien, indem sie seitlich an die ATP-Aktin-Kappe des Filaments bindet (f). Durch die Multimerisierung der EVH2-Domäne (g) könnten alle F-Aktinbindungsregionen simultan mit dem Filament interagieren und dadurch die Verbindung verstärken. Somit würde die Deletion der PRR- und GAB-Domänen mit der Listerienmotilität interferieren, während die Deletion der nicht essentiellen FAB- und Coco-Domänen deren inhibitorische Wirkung aufhebt. Die Phosphorylierung könnte die fördernden Funktionen verstärken oder die inhibierenden Funktionen schwächen (nicht dargestellt).

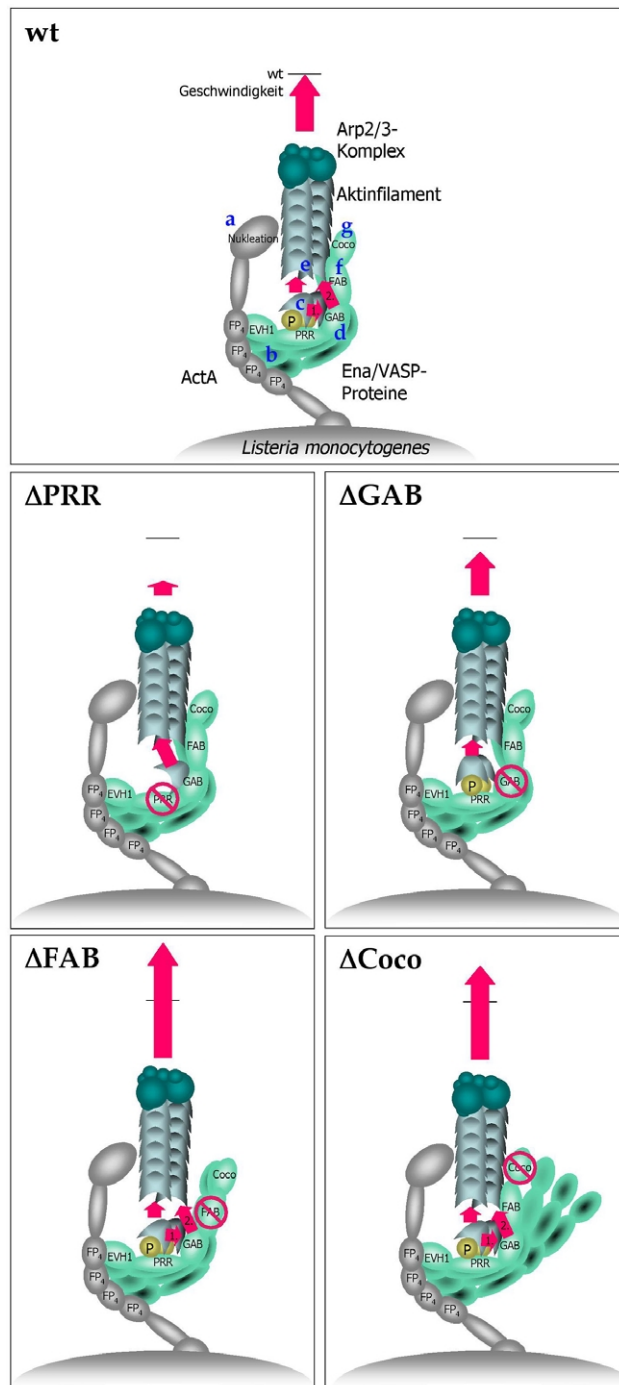


Abbildung 30: Modell der Ena/VASP-Funktionen in der Listerienmotilität

Das obere Bild stellt die Funktionen der wt Ena/VASP-Proteine während der Filamentelongation an motilen Listerien dar. *Listeria monocytogenes* exponiert ActA, das mittels der aminoterminalen Nukleationsdomäne (a) und dem Arp2/3-Komplex die Bildung eines Aktinfilaments induziert. Durch die FP₄-Motive werden Ena/VASP-Multimere über deren EVH1-Domäne gebunden (b). Profilin:Aktin (c) wird durch die Prolin-reichen Regionen (PRR) rekrutiert und das G-Aktin polymerisiert entweder assistiert (d) durch die G-Aktin Bindungsdomäne (GAB) oder direkt am freien "barbed end" (e). Das "barbed end" wird dabei durch die gebundenen F-Aktin-Bindungsdomänen (FAB) ausgerichtet (f), die wiederum von den Multimerisierungsdomänen (Coco) organisiert werden (g). Durch die Deletion der Prolin-reichen Region (ΔPRR) sinkt die Listeriengeschwindigkeit im Vergleich zum wt, da G-Aktin nur noch vermindert polymerisiert. Durch die Deletion der G-Aktin-Bindungsdomäne (ΔGAB) sinkt die Geschwindigkeit leicht, da die assistierende Wirkung in der Polymerisation fehlt. Ohne die behindernde bzw. bei verminderter F-Aktinbindung durch die Deletion der F-Aktinbindungs- (ΔFAB) bzw. Multimerisierungsdomäne (ΔCoco) steigert sich die Geschwindigkeit der Listerien. Details s. Text.

In zellulären Aktin-vermittelten Prozessen können Ena/VASP-Proteine sowohl positiv als auch negativ regulative Elemente sein. So wirken sie als positive Regulatoren während der T-Zell Aktivierung, der Phagozytose (persönliche Mitteilung von Antonio S. Sechi), der Blutplättchen-Aggregation, des Zell-Zell-Kontakt Aufbaus in Kerationozyten und der Ausbreitung von Neutrophilen (Aszodi *et al.*, 1999, Krause *et al.*, 2000, Vasioukhin *et al.*, 2000, Lawrence and Pryzwansky, 2001). Eine durch

Ena/VASP-Proteine vermittelte negative Regulation findet sich in der Gesamtzellmotilität von Fibroblasten und der Wachstumskegelmigration von Nervenzellen (Bashaw *et al.*, 2000, Bear *et al.*, 2000).

Die Vorstellung der Integration für die Aktinpolymerisation sowohl positiver als auch negativer Funktionen in Ena/VASP-Proteinen stimmt mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit erzielt wurden, überein. Während für die effiziente Listerienmotilität nur das Fördern der Filamentelongation durch die Profilin:Aktin-Rekrutierung essentiell sind, haben die Elongation-behindernden Eigenschaften der Aktinfilamentbindung, verstärkt durch Multimerisierung, im zellulärem Kontext sicherlich eine entscheidende Bedeutung. Dafür spricht nicht zuletzt die Konservierung der EVH2-Domäne in der Evolution. Die Bedeutung dieser Ena/VASP-Funktionen liegt möglicherweise in der Ausrichtung der “barbed ends” in der Polymerisationszone oder im Auffangen von Zugkräften.

Das Überwiegen der inhibitorischen Effekte durch die Überexpression von Mena in Fibroblasten würde erklären, warum dadurch die Zellmotilität behindert wird (Bear *et al.*, 2000). Dieser Effekt war dann besonders stark, wenn das überexprimierte Mena an die Zytoplasmamembran gebunden wird. Eine durch überexprimiertes Mena artifiziell verstärkte Bindung an die Filamente im Lamellipodium könnte die Lamellipodienausbreitung inhibieren und dadurch die Zellmotilität verringern.

Auch die Regulation der Aktinfilamentelongation auf Ebene der Ena/VASP-Proteine durch Phosphorylierungen findet während der Adhäsion und Ausbreitung von Neutrophilen statt. Die damit verbundene Ausbildung von Lamellipodien und von “focal adhesions” korreliert mit einer cGMP-abhängigen Phosphorylierung von VASP (Lawrence and Pryzwansky, 2001).

Das hier vorgestellte Model der Ena/VASP-Funktion in der Listerienmotilität wird somit auch in zellulären Polymerisationsprozessen bestätigt.

4.9 Ausblick

Die beschriebenen Zelllinien werden bereits in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Gertler zur Untersuchung der auf Aktindynamik basierenden

zellulären Prozesse verwendet. Dazu gehören Studien zur Gesamtzellmotilität und Lamellipodien-, Stressfaser und “focal adhesion“-Dynamik.

Eine elektronenmikroskopische Analyse der Filamentorganisation im Aktinschweif der Listerien oder in Lamellipodien könnte die Funktionen der Ena/VASP-Domänen und Phosphorylierungen genauer charakterisieren.

Während die Ligandeninteraktionen der Prolin-reichen Regionen und der F-Aktin-Bindungs- sowie der Multimerisierungs-Domäne *in vitro* bereits untersucht wurden, fehlen derartige Informationen für die potentiell G-Aktin bindende Domäne. Auch der Einfluss der verschiedenen Phosphorylierungen auf die Ena/VASP Ligandeninteraktionen bedarf weiterer Analyse.

Diese Arbeit hat sich auf Domänen beschränkt, die in der gesamten Ena/VASP-Familie konserviert sind. Sowohl Mena als auch VASP weisen innerhalb der EVH2-Domäne weitere Regionen mit unbekannter Funktion auf, deren Untersuchung sinnvoll erscheint. Mena bietet zusätzlich einzigartige Domänen im mittleren Teil des Proteins, die durch eine besondere Aminosäurezusammensetzung auffallen. Deren Untersuchung könnte Aufschlüsse über unterschiedlichen Funktionen der Ena/VASP-Familienmitglieder liefern. Die Kombination von Deletionen, z.B. der PRR- mit der GAB- oder mit der FAB-Deletion könnte noch weitergehende Erkenntnisse über das Zusammenspiel der verschiedenen Ena/VASP-Funktionen erbringen.

Die Analyse von Punktmutationen könnte, ohne potentiell konformationsabhängige Veränderungen hervorzurufen, die für die Ligandenbindung essentiellen Wechselwirkungen identifizieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Dynamik des Mikrofilamentsystem eukaryonter Zellen wird durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine reguliert. Das Bakterium *Listeria monocytogenes* benutzt das Mikrofilamentsystem der infizierten Wirtszelle, um sich durch die Kraft der Aktinpolymerisation durch das Zytoplasma zu bewegen. Diese intrazelluläre Listerienmotilität dient als dereguliertes Modellsystem der auf Aktindynamik basierenden zellulären Motilität. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die *in vivo* bisher wenig analysierten Funktionen von Profilin und Ena/VASP-Proteinen in der Aktinpolymerisation an intrazellulären Listerien.

Hierzu wurden Fusionsproteine von Profilin und Ena/VASP-Proteinen mit autofluoreszierenden Proteinen generiert, charakterisiert und in Gewebekulturzellen mit teilweise kontrollierter Rate exprimiert. Diese Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* infiziert und die Funktionen der verschiedenen Fusionsproteine in der Listerienmotilität mittels Videomikroskopie analysiert.

Diese Untersuchungen zeigten, dass Profilin von Ena/VASP-Proteinen geschwindigkeitsabhängig zur Polymerisationszone motiler Listerien rekrutiert wird. Die Listerienmotilität ist abhängig von der exprimierten Ena/VASP-Menge. Sie wird durch die Profilin Rekrutierung sowie durch die potenzielle G-Aktin-Bindungsdomäne gefördert und durch die F-Aktin-Bindungs- wie auch durch die Multimerisierungs-Domäne behindert. Die Ena/VASP-Phosphorylierung wirkt stimulierend auf die Listerienmotilität.

Die erzielten Ergebnisse charakterisieren die Funktionen des Profilin und der Ena/VASP-Proteine während der Filamentelongation an motilen Listerien. Die von den Listerien rekrutierten Ena/VASP-Proteine fördern die Filamentelongation, indem sie Profilin rekrutieren und möglicherweise die Polymerisation zusätzlich katalysieren. Dabei können die Ena/VASP-Proteine wahrscheinlich das sich verlängernde Filamentende mit den Listerien verbinden und die Architektur des aufgebauten Multiligandenkomplex organisieren. Die Aktivität der Ena/VASP-Funktionen wird dabei durch Phosphorylierungen moduliert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abel K, Mieskes G, Walter U: **Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets.** *FEBS Lett* 1995, **370**:184-188.
- Ahern-Djamali SM, Bachmann C, Hua P, Reddy SK, Kastenmeier AS, Walter U, Hoffmann FM: **Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4977-4982.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: **Molekularbiologie der Zelle.** VCH, (1995) 3. Auflage
- Anton IM, Lu W, Mayer BJ, Ramesh N, Geha RS: **The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck.** *J Biol Chem* 1998, **273**:20992-20995.
- Archer SJ, Vinson VK, Pollard TD, Torchia DA: **Secondary structure and topology of Acanthamoeba profilin I as determined by heteronuclear nuclear magnetic resonance spectroscopy.** *Biochemistry* 1993, **32**:6680-6687.
- Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R: **The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function.** *Embo J* 1999, **18**:37-48.
- Bachmann C, Fischer L, Walter U, Reinhard M: **The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation.** *J Biol Chem* 1999, **274**:23549-23557.
- Bailly M, Ichetovkin I, Grant W, Zebda N, Machesky LM, Segall JE, Condeelis J: **The F-actin side binding activity of the Arp2/3 complex is essential for actin nucleation and lamellipod extension.** *Curr Biol* 2001, **11**:620-625.
- Ball LJ, Kuhne R, Hoffmann B, Hafner A, Schmieder P, Volkmer-Engert R, Hof M, Wahl M, Schneider-Mergener J, Walter U, *et al.*: **Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity.** *Embo J* 2000, **19**:4903-4914.
- Bamburg JR: **Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, **15**:185-230.
- Barzik M, Schubert WD, Carl U, Wehland J, Heinz DW: **Crystallization and preliminary X-ray analysis of the EVH1 domain of Vesl-2b.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000, **56**:930-932.
- Bashaw GJ, Kidd T, Murray D, Pawson T, Goodman CS: **Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor.** *Cell* 2000, **101**:703-715.
- Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fassler R, Wehland J, Gertler FB: **Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins.** *Cell* 2000, **101**:717-728.

- Beckerle MC: **Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion.** *Bioessays* 1997, **19**:949-957.
- Beckerle MC: **Spatial control of actin filament assembly: lessons from Listeria.** *Cell* 1998, **95**:741-748.
- Bjorkegren C, Rozycki M, Schutt CE, Lindberg U, Karlsson R: **Mutagenesis of human profilin locates its poly(L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids.** *FEBS Lett* 1993, **333**:123-126.
- Bjorkegren-Sjogren C, Korenbaum E, Nordberg P, Lindberg U, Karlsson R: **Isolation and characterization of two mutants of human profilin I that do not bind poly(L-proline).** *FEBS Lett* 1997, **418**:258-264.
- Blanchoin L and Pollard TD: **Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments.** *J Biol Chem* 1999, **274**:15538-15546.
- Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD: **Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins.** *Nature* 2000, **404**:1007-1011.
- Brindle NP, Holt MR, Davies JE, Price CJ, Critchley DR: **The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin.** *Biochem J* 1996, **318**:753-757.
- Buss F, Temm-Grove C, Henning S, Jockusch BM: **Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1992, **22**:51-61.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U: **cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets.** *J Biol Chem* 1994, **269**:14509-14517.
- Cameron LA, Giardini PA, Soo FS, Theriot JA: **Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**:110-119.
- Carl UD, Pollmann M, Orr E, Gertlere FB, Chakraborty T, Wehland J: **Aromatic and basic residues within the EVH1 domain of VASP specify its interaction with proline-rich ligands.** *Curr Biol* 1999, **9**:715-718.
- Carlier MF and Pantaloni D: **Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin beta 4 and profilin.** *Semin Cell Biol* 1994, **5**:183-191.
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D: **Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility.** *J Cell Biol* 1997, **136**:1307-1322.
- Carlier MF: **Control of actin dynamics.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**:45-51.
- Carlsson L, Nystrom LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U: **Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells.** *J Mol Biol* 1977, **115**:465-483.

- Chakraborty T and Goebel W: **Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes***. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988, **138**:41-58.
- Chakraborty T, Ebel F, Domann E, Niebuhr K, Gerstel B, Pistor S, Temm-Grove CJ, Jockusch BM, Reinhard M, Walter U, *et al.*: **A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells**. *Embo J* 1995, **14**:1314-1321.
- Chaudhary A, Chen J, Gu QM, Witke W, Kwiatkowski DJ, Prestwich GD: **Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I**. *Chem Biol* 1998, **5**:273-281.
- Cooley L, Verheyen E, Ayers K: **chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis**. *Cell* 1992, **69**:173-184.
- Cossart P and Kocks C: **The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes***. *Mol Microbiol* 1994, **13**:395-402.
- Cossart P and Portnoy DA: **The Cell Biology of Invasion and Intracellular Growth by *Listeria monocytogenes***. **Gram-Positive Pathogens**. (2000) American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Cossart P and Bierne H: **The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes***. *Curr Opin Immunol* 2001, **13**:96-103.
- DeRosier DJ and Tilney LG: **F-actin bundles are derivatives of microvilli: What does this tell us about how bundles might form?** *J Cell Biol* 2000, **148**:1-6.
- Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W: **Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms**. *J Cell Sci* 2000, **113 Pt 21**:3795-3803.
- Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, Leimeister-Wachter M, Wuenscher M, Chakraborty T: **A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin**. *Embo J* 1992, **11**:1981-1990.
- Dramsi S, Kocks C, Forestier C, Cossart P: **Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA**. *Mol Microbiol* 1993, **9**:931-941.
- Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P: **Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family**. *Mol Microbiol* 1995, **16**:251-261.
- Dramsi S and Cossart P: **Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton**. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998, **14**:137-166.
- Drees B, Friederich E, Fradelizi J, Louvard D, Beckerle MC, Golsteyn RM: **Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins**. *J Biol Chem* 2000, **275**:22503-22511.

- Dytham C: **Choosing and using statistics, a biologist's guide.** Blackwell Science Ltd., (2000)
- Ebel F, Rohde M, von Eichel-Streiber C, Wehland J, Chakraborty T: **The actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* is not controlled by small GTP-binding proteins of the Rho- and Ras-subfamilies.** *FEMS Microbiol Lett* 1999, **176**:117-124.
- Ermekova KS, Zambrano N, Linn H, Minopoli G, Gertler F, Russo T, Sudol M: **The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled.** *J Biol Chem* 1997, **272**:32869-32877.
- Fedorov AA, Fedorov E, Gertler F, Almo SC: **Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function.** *Nat Struct Biol* 1999, **6**:661-665.
- Finkel T, Theriot JA, Dose KR, Tomaselli GF, Goldschmidt-Clermont PJ: **Dynamic actin structures stabilized by profilin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:1510-1514.
- Frankel S and Mooseker MS: **The actin-related proteins.** *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**:30-37.
- Fradelizi J, Noireaux V, Plastino J, Menichi B, Louvard D, Sykes C, Goldsteyn RM, Friederich E: **ActA and human zyxin harbour Arp2/3 independent actin-polymerization activity.** *Nat Cell Biol* 2000, **3**, 699-706
- Friederich E, Gouin E, Hellio R, Kocks C, Cossart P, Louvard D: **Targeting of *Listeria monocytogenes* ActA protein to the plasma membrane as a tool to dissect both actin-based cell morphogenesis and ActA function.** *Embo J* 1995, **14**:2731-2744.
- Frischknecht F and Way M: **Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:30-38.
- Gaillard JL, Berche P, Sansonetti P: **Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*.** *Infect Immun* 1986, **52**:50-55.
- Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P: **Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci.** *Cell* 1991, **65**:1127-1141.
- Geese M, Schluter K, Rothkegel M, Jockusch BM, Wehland J, Sechi AS: **Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed.** *J Cell Sci* 2000, **113**:1415-1426.
- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P: **Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*.** *Infect Immun* 1987, **55**:1641-1646.
- Gertler FB, Doctor JS, Hoffmann FM: **Genetic suppression of mutations in the *Drosophila* abl proto-oncogene homolog.** *Science* 1990, **248**:857-860.

- Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P: **Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics.** *Cell* 1996, **87**:227-239.
- Gieselmann R, Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Witke W: **Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms.** *Eur J Biochem* 1995, **229**:621-628.
- Gieseemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H: **A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems.** *J Biol Chem* 1999, **274**:37908-37914.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Baldassare JJ, Pollard TD: **The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C.** *Science* 1990, **247**:1575-1578.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Kim JW, Machesky LM, Rhee SG, Pollard TD: **Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation.** *Science* 1991, **251**:1231-1233.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD: **The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells.** *Mol Biol Cell* 1992, **3**:1015-1024.
- Gouin E, Gantelet H, Egile C, Lasa I, Ohayon H, Villiers V, Gounon P, Sansonetti PJ, Cossart P: **A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*.** *J Cell Sci* 1999, **112**:1697-1708.
- Haffner C, Jarchau T, Reinhard M, Hoppe J, Lohmann SM, Walter U: **Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP.** *Embo J* 1995, **14**:19-27.
- Hajkova L, Bjorkegren Sjogren C, Korenbaum E, Nordberg P, Karlsson R: **Characterization of a mutant profilin with reduced actin-binding capacity: effects in vitro and in vivo.** *Exp Cell Res* 1997, **234**:66-77.
- Halbrugge M and Walter U: **Analysis, purification and properties of a 50,000-dalton membrane-associated phosphoprotein from human platelets.** *J Chromatogr* 1990, **521**:335-343.
- Halbrugge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Walter U: **Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators.** *J Biol Chem* 1990, **265**:3088-3093.
- Hall A and Nobes CD: **Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000, **355**:965-970.

- Harbeck B, Hüttelmaier S, Schluter K, Jockusch BM, Illenberger S: **Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin.** *J Biol Chem* 2000, **275**:30817-30825.
- Harlow E, Lane D: **Using Antibodies, A laboratory Manual.** (1999) Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Haugwitz M, Noegel AA, Karakesisoglou J, Schleicher M: **Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development.** *Cell* 1994, **79**:303-314.
- Heath JP and Holifield BF: **On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organisation of fibroblasts.** *Symp Soc Exp Biol* 1993, **47**:35-56.
- Heinzen RA, Grieshaber SS, Van Kirk LS, Devin CJ: **Dynamics of actin-based movement by Rickettsia rickettsii in vero cells.** *Infect Immun* 1999, **67**:4201-4207.
- Higley S and Way M: **Actin and cell pathogenesis.** *Curr Opin Cell Biol* 1997, **9**:62-69.
- Holt MR and Koffer A: **Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:38-46.
- Honore B, Madsen P, Andersen AH, Leffers H: **Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II.** *FEBS Lett* 1993, **330**:151-155.
- Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U: **Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition.** *Eur J Biochem* 1994, **225**:21-27.
- Hüttelmaier S, Harbeck B, Steffens O, Messerschmidt T, Illenberger S, Jockusch BM: **Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP.** *FEBS Lett* 1999, **451**:68-74.
- Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rudiger M, Schluter K, Stanke G, Winkler J: **The molecular architecture of focal adhesions.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, **11**:379-416.
- Jonckheere V, Lambrechts A, Vandekerckhove J, Ampe C: **Dimerization of profilin II upon binding the (GP5)3 peptide from VASP overcomes the inhibition of actin nucleation by profilin II and thymosin beta4.** *FEBS Lett* 1999, **447**:257-263.
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M: **Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:459-486.
- Kang F, Laine RO, Bubb MR, Southwick FS, Purich DL: **Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin-based Listeria motility.** *Biochemistry* 1997, **36**:8384-8392.

- Kang F, Purich DL, Southwick FS: **Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration.** *J Biol Chem* 1999, **274**:36963-36972.
- Kathariou S, Metz P, Hof H, Goebel W: **Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*.** *J Bacteriol* 1987, **169**:1291-1297.
- Kelleher JF, Atkinson SJ, Pollard TD: **Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*.** *J Cell Biol* 1995, **131**:385-397.
- Klostermann A, Lutz B, Gertler F, Behl C: **The orthologous human and murine semaphorin 6A-1 proteins (SEMA6A-1/Sema6A-1) bind to the enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein (EVL) via a novel carboxyl-terminal zyxin-like domain.** *J Biol Chem* 2000, **275**:39647-39653.
- Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H, Cossart P: ***L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein.** *Cell* 1992, **68**:521-531.
- Kocks C, Marchand JB, Gouin E, d'Hauteville H, Sansonetti PJ, Carlier MF, Cossart P: **The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively.** *Mol Microbiol* 1995, **18**:413-423.
- Korenbaum E, Nordberg P, Bjorkegren-Sjogren C, Schutt CE, Lindberg U, Karlsson R: **The role of profilin in actin polymerization and nucleotide exchange.** *Biochemistry* 1998, **37**:9274-9283.
- Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB, Wehland J: **Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton.** *J Cell Biol* 2000, **149**:181-194.
- Kuo SC and McGrath JL: **Steps and fluctuations of *Listeria monocytogenes* during actin-based motility.** *Nature* 2000, **407**:1026-1029.
- Lambrechts A, van Damme J, Goethals M, Vandekerckhove J, Ampe C: **Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L-proline) and inositolphospholipid binding.** *Eur J Biochem* 1995, **230**:281-286.
- Lambrechts A, Verschelde JL, Jonckheere V, Goethals M, Vandekerckhove J, Ampe C: **The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences.** *Embo J* 1997, **16**:484-494.
- Lambrechts A, Braun A, Jonckheere V, Aszodi A, Lanier LM, Robbens J, Van Colen I, Vandekerckhove J, Fassler R, Ampe C: **Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties.** *Mol Cell Biol* 2000 a, **20**:8209-8219.

- Lambrechts A, Kwiatkowski AV, Lanier LM, Bear JE, Vandekerckhove J, Ampe C, Gertler FB: **cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains.** *J Biol Chem* 2000 b, **275**:36143-36151.
- Lanier LM, Gates MA, Witke W, Menzies AS, Wehman AM, Macklis JD, Kwiatkowski D, Soriano P, Gertler FB: **Mena is required for neurulation and commissure formation.** *Neuron* 1999, **22**:313-325.
- Lasa I, David V, Gouin E, Marchand JB, Cossart P: **The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator.** *Mol Microbiol* 1995, **18**:425-436.
- Lasa I, Gouin E, Goethals M, Vancompernelle K, David V, Vandekerckhove J, Cossart P: **Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*.** *Embo J* 1997, **16**:1531-1540.
- Lassing I and Lindberg U: **Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin.** *Nature* 1985, **314**:472-474.
- Lassing I and Lindberg U: **Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex.** *J Cell Biochem* 1988, **37**:255-267.
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Grobe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB, Carlier MF: **Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*.** *J Cell Biol* 1999, **144**:1245-1258.
- Lawrence DW, Pryzwansky KB: **The vasodilator-stimulated phosphoprotein is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase during neutrophil spreading.** *J Immunol.* 2001;**166**(9):5550-6.
- Lee SS, Karakesisoglou I, Noegel AA, Rieger D, Schleicher M: **Dissection of functional domains by expression of point-mutated profilins in *Dictyostelium* mutants.** *Eur J Cell Biol* 2000, **79**:92-103.
- Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J, Chakraborty T: **Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms.** *Infect Immun* 1995, **63**:3896-3903.
- Liu K, Li L, Nisson PE, Gruber C, Jessee J, Cohen SN: **Reversible tumorigenesis induced by deficiency of vasodilator-stimulated phosphoprotein.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:3696-3703.
- Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier MF: **Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins.** *Nature* 1999, **401**:613-616.
- Lu J and Pollard TD: **Profilin Binding to Poly-L-Proline and Actin Monomers along with Ability to Catalyze Actin Nucleotide Exchange Is Required for Viability of Fission Yeast.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:1161-1175.

- Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD: **Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose.** *J Cell Biol* 1994, **127**:107-115.
- Machesky LM, Reeves E, Wientjes F, Mattheyse FJ, Grogan A, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ, Segal AW: **Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins.** *Biochem J* 1997, **328**:105-112.
- Machesky LM and Insall RH: **Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex.** *Curr Biol* 1998, **8**:1347-1356.
- Machesky LM and Gould KL: **The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer.** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**:117-121.
- Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD: **Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:3739-3744.
- Machesky LM: **Putting on the brakes: a negative regulatory function for Ena/VASP proteins in cell migration.** *Cell* 2000, **101**:685-688.
- Machner MP, Urbanke C, Barzik M, Otten S, Sechi AS, Wehland J, Dirk W. Heinz DW: **ActA from *Listeria monocytogenes* can interact with up to four Ena/VASP homology 1 domains simultaneously.** Eingereichtes Manuskript 2001
- Mahoney NM, Janmey PA, Almo SC: **Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation.** *Nat Struct Biol* 1997, **4**:953-960.
- Mallavarapu A and Mitchison T: **Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction.** *J Cell Biol* 1999, **146**:1097-1106.
- Marchand JB, Moreau P, Paoletti A, Cossart P, Carlier MF, Pantaloni D: **Actin-based movement of *Listeria monocytogenes*: actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface.** *J Cell Biol* 1995, **130**:331-343.
- Mayboroda O, Schluter K, Jockusch BM: **Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1997, **37**:166-177.
- McCollum D, Feoktistova A, Morpew M, Balasubramanian M, Gould KL: **The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin.** *Embo J* 1996, **15**:6438-6446.
- Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G, Wunderlich I, Almers W: **Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**:72-74.

- Metzler WJ, Constantine KL, Friedrichs MS, Bell AJ, Ernst EG, Lavoie TB, Mueller L: **Characterization of the three-dimensional solution structure of human profilin: ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR assignments and global folding pattern.** *Biochemistry* 1993, **32**:13818-13829.
- Metzler WJ, Bell AJ, Ernst E, Lavoie TB, Mueller L: **Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin.** *J Biol Chem* 1994, **269**:4620-4625.
- Metzler WJ, Farmer BT, Constantine KL, Friedrichs MS, Lavoie T, Mueller L: **Refined solution structure of human profilin I.** *Protein Sci* 1995, **4**:450-459.
- Michaille JJ, Gouy M, Blanchet S, Duret L: **Isolation and characterization of a cDNA encoding a chicken actin-like protein.** *Gene* 1995, **154**:205-209.
- Mimuro H, Suzuki T, Suetsugu S, Miki H, Takenawa T, Sasakawa C: **Profilin is required for sustaining efficient intra- and intercellular spreading of *Shigella flexneri*.** *J Biol Chem* 2000, **275**:28893-28901.
- Mogilner A and Oster G: **Cell motility driven by actin polymerization.** *Biophys J* 1996, **71**:3030-3045.
- Moreau V, Madania A, Martin RP, Winson B: **The *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton.** *J Cell Biol* 1996, **134**:117-132.
- Mullins RD, Stafford WF, Pollard TD: **Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*.** *J Cell Biol* 1997, **136**:331-343.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD: **The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:6181-6186.
- Mullins RD and Pollard TD: **Structure and function of the Arp2/3 complex.** *Curr Opin Struct Biol* 1999, **9**:244-249.
- Nachmias VT: **Small actin-binding proteins: the beta-thymosin family.** *Curr Opin Cell Biol* 1993, **5**:56-62.
- Nakagawa H, Miki H, Ito M, Ohashi K, Takenawa T, Miyamoto S: **N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia.** *J Cell Sci* 2001, **114**:1555-1565.
- Neely MD and Macaluso E: **Motile areas of leech neurites are rich in microfilaments and two actin-binding proteins: gelsolin and profilin.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1997, **264**:1701-1706.
- Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J, Chakraborty T: **A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family.** *Embo J* 1997, **16**:5433-5444.
- Nodelman IM, Bowman GD, Lindberg U, Schutt CE: **X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins.** *J Mol Biol* 1999, **294**:1271-1285.

- Nolte C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Walter U: **Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors.** *J Biol Chem* 1991, **266**:14808-14812.
- Pantaloni D and Carlier MF: **How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4.** *Cell* 1993, **75**:1007-1014.
- Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF: **Mechanism of actin-based motility.** *Science* 2001, **292**:1502-1506.
- Pistor S, Chakraborty T, Niebuhr K, Domann E, Wehland J: **The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton.** *Embo J* 1994, **13**:758-763.
- Pistor S, Chakraborty T, Walter U, Wehland J: **The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins.** *Curr Biol* 1995, **5**:517-525.
- Pistor S, Grobe L, Sechi AS, Domann E, Gerstel B, Machesky LM, Chakraborty T, Wehland J: **Mutations of arginine residues within the 146-KKRRK-150 motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the recruitment of the Arp2/3 complex.** *J Cell Sci* 2000, **113**:3277-3287.
- Prehoda KE, Lee DJ, Lim WA: **Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly.** *Cell* 1999, **97**:471-480.
- Raghunathan V, Mowery P, Rozycki M, Lindberg U, Schutt C: **Structural changes in profilin accompany its binding to phosphatidylinositol, 4,5-bisphosphate.** *FEBS Lett* 1992, **297**:46-50.
- Reinhard M, Halbrugge M, Scheer U, Wiegand C, Jockusch BM, Walter U: **The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts.** *Embo J* 1992, **11**:2063-2070.
- Reinhard M, Jouvenal K, Tripier D, Walter U: **Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:7956-7960.
- Reinhard M, Rudiger M, Jockusch BM, Walter U: **VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs.** *FEBS Lett.* 1996;399(1-2):103-7.
- Reinhard M, Jarchau T, Walter U: **Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**:243-249.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW: **The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly.** *Cell* 1999, **97**:221-231.
- Rothkegel M, Mayboroda O, Rohde M, Wucherpennig C, Valenta R, Jockusch BM: **Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells.** *J Cell Sci* 1996, **109**:83-90.

- Rottner K, Behrendt B, Small JV, Wehland J: **VASP dynamics during lamellipodia protrusion.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**:321-322.
- Rudiger M, Jockusch BM, Rothkegel M: **Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells.** *Biotechniques* 1997, **23**:96-97.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning, A laboratory Manual.** Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989) Vol. 1-3
- Sanger JM, Sanger JW, Southwick FS: **Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of Listeria monocytogenes.** *Infect Immun* 1992, **60**:3609-3619.
- Sanger JM, Mittal B, Southwick FS, Sanger JW: **Listeria monocytogenes intracellular migration: inhibition by profilin, vitamin D-binding protein and DNase I.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1995, **30**:38-49.
- Schafer DA, Welch MD, Machesky LM, Bridgman PC, Meyer SM, Cooper JA: **Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells.** *J Cell Biol* 1998, **143**:1919-1930.
- Schlech III. WF: **Epidemiology and Clinical Manifestations of Listeria monocytogenes Infection. Gram-Positive Pathogens.** (2000) American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Schluter K, Jockusch BM, Rothkegel M: **Profilins as regulators of actin dynamics.** *Biochim Biophys Acta* 1997, **1359**:97-109.
- Schluter K, Schleicher M, Jockusch BM: **Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I.** *J Cell Sci* 1998, **111**:3261-3273.
- Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L: **Rho GTPases: signaling, migration, and invasion.** *Exp Cell Res* 2000, **261**:1-12.
- Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NC, Lindberg U: **The structure of crystalline profilin-beta-actin.** *Nature* 1993, **365**:810-816.
- Sechi AS, Wehland J, Small JV: **The isolated comet tail pseudopodium of Listeria monocytogenes: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random.** *J Cell Biol* 1997, **137**:155-167.
- Skoble J, Portnoy DA, Welch MD: **Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and Listeria monocytogenes motility.** *J Cell Biol* 2000, **150**:527-538.
- Small JV, Isenberg G, Celis JE: **Polarity of actin at the leading edge of cultured cells.** *Nature* 1978, **272**:638-639.
- Small JV, Herzog M, Anderson K: **Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium.** *J Cell Biol* 1995, **129**:1275-1286.
- Small JV, Anderson K, Rottner K: **Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling.** *Biosci Rep* 1996, **16**:351-368.

- Smith GA, Theriot JA, Portnoy DA: **The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin.** *J Cell Biol* 1996, **135**:647-660.
- Sohn RH and Goldschmidt-Clermont PJ: **Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton.** *Bioessays* 1994, **16**:465-472.
- Sohn RH, Chen J, Koblan KS, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ: **Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin.** *J Biol Chem* 1995, **270**:21114-21120.
- Southwick FS and Purich DL: **Arrest of *Listeria* movement in host cells by a bacterial ActA analogue: implications for actin-based motility.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:5168-5172.
- Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA: **Cells, A laboratory Manual.** Cold Spring Harbour Laboratory Press (1998) Vol. 1-3
- Suetsugu S, Miki H, Takenawa T: **The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation.** *Embo J* 1998, **17**:6516-6526.
- Sun HQ, Kwiatkowska K, Yin HL: **Actin monomer binding proteins.** *Curr Opin Cell Biol* 1995, **7**:102-110.
- Svitkina TM and Borisy GG: **Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia.** *J Cell Biol* 1999, **145**:1009-1026.
- Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T, Terada M: **Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer.** *Cancer Res* 1992, **52**:3372-3377.
- Temm-Grove CJ, Jockusch BM, Rohde M, Niebuhr K, Chakraborty T, Wehland J: **Exploitation of microfilament proteins by *Listeria monocytogenes*: microvillus-like composition of the comet tails and vectorial spreading in polarized epithelial sheets.** *J Cell Sci* 1994, **107**:2951-2960.
- Theriot JA and Mitchison TJ: **Actin microfilament dynamics in locomoting cells.** *Nature* 1991, **352**:126-131.
- Theriot JA, Mitchison TJ, Tilney LG, Portnoy DA: **The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization.** *Nature* 1992, **357**:257-260.
- Theriot JA, Rosenblatt J, Portnoy DA, Goldschmidt-Clermont PJ, Mitchison TJ: **Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts.** *Cell* 1994, **76**:505-517.
- Theriot JA: **The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, **11**:213-239.
- Theriot JA: **Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton.** *J Cell Biol* 1997, **136**:1165-1168.

- Tilney LG and Portnoy DA: **Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*.** *J Cell Biol* 1989, **109**:1597-1608.
- Van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C: **The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis.** *Embo J* 1996, **15**:201-210.
- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E: **Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion.** *Cell* 2000, **100**:209-219.
- Verheyen EM and Cooley L: **Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development.** *Development* 1994, **120**:717-728.
- Vinson VK, Archer SJ, Lattman EE, Pollard TD, Torchia DA: **Three-dimensional solution structure of *Acanthamoeba* profilin-I.** *J Cell Biol* 1993, **122**:1277-1283.
- Wang YL: **Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling.** *J Cell Biol* 1985, **101**:597-602.
- Wang X, Kibschull M, Laue MM, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW: **Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin.** *J Cell Biol* 1999, **147**:151-162.
- Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S: **p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin.** *Embo J* 1997, **16**:3044-3056.
- Welch MD, Mallavarapu A, Rosenblatt J, Mitchison TJ: **Actin dynamics in vivo.** *Curr Opin Cell Biol* 1997 a, **9**:54-61.
- Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ: **The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly.** *J Cell Biol* 1997 b, **138**:375-384.
- Welch MD, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy DA, Mitchison TJ: **Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation.** *Science* 1998, **281**:105-108.
- Welch MD: **The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex.** *Trends Cell Biol* 1999, **9**:423-427.
- Wills Z, Marr L, Zinn K, Goodman CS, Van Vactor D: **Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo.** *Neuron* 1999, **22**:291-299.
- Winter D, Lechler T, Li R: **Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein.** *Curr Biol* 1999, **9**:501-504.
- Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, Mann M: **In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly.** *Embo J* 1998, **17**:967-976.

- Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M, Kwiatkowski DJ: **Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:3832-3836.
- Yarar D, To W, Abo A, Welch MD: **The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex.** *Curr Biol* 1999, **9**:555-558.
- Zalevsky J, Grigorova I, Mullins RD: **Activation of the Arp2/3 complex by the Listeria acta protein. Acta binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex.** *J Biol Chem* 2001, **276**:3468-3475.
- Zeile WL, Purich DL, Southwick FS: **Recognition of two classes of oligoproline sequences in profilin-mediated acceleration of actin-based Shigella motility.** *J Cell Biol* 1996, **133**:49-59.
- Zhukarev V, Ashton F, Sanger JM, Sanger JW, Shuman H: **Organization and structure of actin filament bundles in Listeria-infected cells.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1995, **30**:229-246

7 DANKSAGUNG

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Zellbiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) durchgeführt.

Mein großer Dank gilt:

- Prof. Dr. Jürgen Wehland für die engagierte Unterstützung und Betreuung meiner gesamten Arbeit und für die Ermöglichung der Kooperationen.
- Dr. Antonio Sechi für sein vermitteltes Wissen und Erfahrungen, seine motivierende, unermüdliche Betreuung und die essentiellen Diskussionen.
- Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch, Dr. Kathrin Schlüter, Dr. Martin Rothkegel, Dr. Birgitt Harbeck und Nina Wittenmayer (Abteilung Zoologie, TU Braunschweig) für ihre Zusammenarbeit in der biochemischen Charakterisierung der Profiline.
- Prof. Dr. Frank Gertler, Dr. Joseph J. Loureiro, Dr. Jim Bear und allen anderen Mitgliedern des Gertler Labs (Biology, MIT, Boston MA) für die erfolgreiche Kooperation in der Ena/VASP-Arbeit und für ihre Gastfreundschaft in Boston.
- Marlies Konradt und Petra Hagendorf für ihre Hilfe, Tips und Protokolle im Laboralltag.
- Maria Höxter und Dr. David Monner (GBF), Thoralf König (Rheuma Zentrum, Berlin), Stefan Krusch und Karsten Kretschmer (Abteilung Immunologie, GBF) fürs FACS.
- Allen Kollegen in der GBF für die tolle Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima: Maja Baumgärtner, Melanie Barzik, Dr. Barbara Behrendt, Steffi Benesch, Werner Bokranz, Dr. Judith Dädelow, Brigitte Denker, Dr. Oliver Diekmann, Dr. Christian Erck (speziell für die vielen Tips und Anregungen bis zur Korrektur dieser Arbeit), Dr. Birgit Gerstel, Ulrich Gerstel, Dr. Lothar Gröbe, Dr. Dirk Heinz (besonders für die Übernahme des Koreffrates), Dr. Lothar Jänsch, Andrea Jenzora, Dr. Uwe Kärst, Dr. Henryk Kalisz, Andreas Kresse, Carsten Kranz, Dr. Matthias Krause, Kena Küch, Silvia Lommel, Dr. Simone Müller, Matthias Machner, Dr. Dave Monner,

Helen Morrison, Amanda Mühlmann, Reiner Munder, Vivienne Olaku, Sandra Pilawa, Dr. Susanne Pistor, Sascha Pust, Tamer Rabie, Dr. Ute Römling, Dr. Klemens Rottner, Conny Rudolph, Jessica Schaumburg, Kerstin Schilling, Tobias Sperker, Anika Stefen, Dr. Teresia Stradal, Dirk Wehmhöner, Dr. Joseph Wissing, Xhavit Zogay.

- meiner Familie, deren Unterstützung diese Arbeit ermöglichte.